

**ZU VORKOMMEN UND BILDUNG
VON STAPHYLOKOKKENENTEROTOXIN B
IN TRINKMILCH**

Franz Brunnthaler

1976

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. G. Terplan

ZU VORKOMMEN UND BILDUNG
VON STAPHYLOKOKKENENTEROTOXIN B
IN TRINKMILCH

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München



von
Franz Brunnthaler
aus
Pfaffenhofen a.d. Ilm

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Professor Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Professor Dr. G. Terplan
Korreferent: Professor Dr. H. Erbersdobler

Tag der Promotion: 30. Juli 1976



Inhaltsverzeichnis

1. Darstellung der Aufgabenstellung und der Aufgabenstellung	1
2. Zielsetzung der Untersuchung	2
3. Darstellung der Untersuchungsmethoden	3
4. Darstellung der Untersuchungsergebnisse	4
5. Diskussion der Ergebnisse	5
6. Zusammenfassung	6
7. Literaturverzeichnis	7
8. Anhang	8
9. Bibliographie	9
10. Zusammenfassung	10
11. Literaturverzeichnis	11
12. Anhang	12
13. Bibliographie	13
14. Zusammenfassung	14
15. Literaturverzeichnis	15
16. Anhang	16
17. Bibliographie	17
18. Zusammenfassung	18
19. Literaturverzeichnis	19
20. Anhang	20
21. Bibliographie	21
22. Zusammenfassung	22
23. Literaturverzeichnis	23
24. Anhang	24
25. Bibliographie	25
26. Zusammenfassung	26
27. Literaturverzeichnis	27
28. Anhang	28
29. Bibliographie	29
30. Zusammenfassung	30
31. Literaturverzeichnis	31
32. Anhang	32
33. Bibliographie	33
34. Zusammenfassung	34
35. Literaturverzeichnis	35
36. Anhang	36
37. Bibliographie	37
38. Zusammenfassung	38
39. Literaturverzeichnis	39
40. Anhang	40
41. Bibliographie	41
42. Zusammenfassung	42
43. Literaturverzeichnis	43
44. Anhang	44
45. Bibliographie	45
46. Zusammenfassung	46
47. Literaturverzeichnis	47
48. Anhang	48
49. Bibliographie	49
50. Zusammenfassung	50
51. Literaturverzeichnis	51
52. Anhang	52
53. Bibliographie	53
54. Zusammenfassung	54
55. Literaturverzeichnis	55
56. Anhang	56
57. Bibliographie	57
58. Zusammenfassung	58
59. Literaturverzeichnis	59
60. Anhang	60
61. Bibliographie	61
62. Zusammenfassung	62
63. Literaturverzeichnis	63
64. Anhang	64
65. Bibliographie	65
66. Zusammenfassung	66
67. Literaturverzeichnis	67
68. Anhang	68
69. Bibliographie	69
70. Zusammenfassung	70
71. Literaturverzeichnis	71
72. Anhang	72
73. Bibliographie	73
74. Zusammenfassung	74
75. Literaturverzeichnis	75
76. Anhang	76
77. Bibliographie	77
78. Zusammenfassung	78
79. Literaturverzeichnis	79
80. Anhang	80
81. Bibliographie	81
82. Zusammenfassung	82
83. Literaturverzeichnis	83
84. Anhang	84
85. Bibliographie	85
86. Zusammenfassung	86
87. Literaturverzeichnis	87
88. Anhang	88
89. Bibliographie	89
90. Zusammenfassung	90
91. Literaturverzeichnis	91
92. Anhang	92
93. Bibliographie	93
94. Zusammenfassung	94
95. Literaturverzeichnis	95
96. Anhang	96
97. Bibliographie	97
98. Zusammenfassung	98
99. Literaturverzeichnis	99
100. Anhang	100
101. Bibliographie	101
102. Zusammenfassung	102
103. Literaturverzeichnis	103
104. Anhang	104
105. Bibliographie	105
106. Zusammenfassung	106
107. Literaturverzeichnis	107
108. Anhang	108
109. Bibliographie	109
110. Zusammenfassung	110
111. Literaturverzeichnis	111
112. Anhang	112
113. Bibliographie	113
114. Zusammenfassung	114
115. Literaturverzeichnis	115
116. Anhang	116
117. Bibliographie	117
118. Zusammenfassung	118
119. Literaturverzeichnis	119
120. Anhang	120
121. Bibliographie	121
122. Zusammenfassung	122
123. Literaturverzeichnis	123
124. Anhang	124
125. Bibliographie	125
126. Zusammenfassung	126
127. Literaturverzeichnis	127
128. Anhang	128
129. Bibliographie	129
130. Zusammenfassung	130
131. Literaturverzeichnis	131
132. Anhang	132
133. Bibliographie	133
134. Zusammenfassung	134
135. Literaturverzeichnis	135
136. Anhang	136
137. Bibliographie	137
138. Zusammenfassung	138
139. Literaturverzeichnis	139
140. Anhang	140
141. Bibliographie	141
142. Zusammenfassung	142
143. Literaturverzeichnis	143
144. Anhang	144
145. Bibliographie	145
146. Zusammenfassung	146
147. Literaturverzeichnis	147
148. Anhang	148
149. Bibliographie	149
150. Zusammenfassung	150
151. Literaturverzeichnis	151
152. Anhang	152
153. Bibliographie	153
154. Zusammenfassung	154
155. Literaturverzeichnis	155
156. Anhang	156
157. Bibliographie	157
158. Zusammenfassung	158
159. Literaturverzeichnis	159
160. Anhang	160
161. Bibliographie	161
162. Zusammenfassung	162
163. Literaturverzeichnis	163
164. Anhang	164
165. Bibliographie	165
166. Zusammenfassung	166
167. Literaturverzeichnis	167
168. Anhang	168
169. Bibliographie	169
170. Zusammenfassung	170
171. Literaturverzeichnis	171
172. Anhang	172
173. Bibliographie	173
174. Zusammenfassung	174
175. Literaturverzeichnis	175
176. Anhang	176
177. Bibliographie	177
178. Zusammenfassung	178
179. Literaturverzeichnis	179
180. Anhang	180
181. Bibliographie	181
182. Zusammenfassung	182
183. Literaturverzeichnis	183
184. Anhang	184
185. Bibliographie	185
186. Zusammenfassung	186
187. Literaturverzeichnis	187
188. Anhang	188
189. Bibliographie	189
190. Zusammenfassung	190
191. Literaturverzeichnis	191
192. Anhang	192
193. Bibliographie	193
194. Zusammenfassung	194
195. Literaturverzeichnis	195
196. Anhang	196
197. Bibliographie	197
198. Zusammenfassung	198
199. Literaturverzeichnis	199
200. Anhang	200
201. Bibliographie	201
202. Zusammenfassung	202
203. Literaturverzeichnis	203
204. Anhang	204
205. Bibliographie	205
206. Zusammenfassung	206
207. Literaturverzeichnis	207
208. Anhang	208
209. Bibliographie	209
210. Zusammenfassung	210
211. Literaturverzeichnis	211
212. Anhang	212
213. Bibliographie	213
214. Zusammenfassung	214
215. Literaturverzeichnis	215
216. Anhang	216
217. Bibliographie	217
218. Zusammenfassung	218
219. Literaturverzeichnis	219
220. Anhang	220
221. Bibliographie	221
222. Zusammenfassung	222
223. Literaturverzeichnis	223
224. Anhang	224
225. Bibliographie	225
226. Zusammenfassung	226
227. Literaturverzeichnis	227
228. Anhang	228
229. Bibliographie	229
230. Zusammenfassung	230
231. Literaturverzeichnis	231
232. Anhang	232
233. Bibliographie	233
234. Zusammenfassung	234
235. Literaturverzeichnis	235
236. Anhang	236
237. Bibliographie	237
238. Zusammenfassung	238
239. Literaturverzeichnis	239
240. Anhang	240
241. Bibliographie	241
242. Zusammenfassung	242
243. Literaturverzeichnis	243
244. Anhang	244
245. Bibliographie	245
246. Zusammenfassung	246
247. Literaturverzeichnis	247
248. Anhang	248
249. Bibliographie	249
250. Zusammenfassung	250
251. Literaturverzeichnis	251
252. Anhang	252
253. Bibliographie	253
254. Zusammenfassung	254
255. Literaturverzeichnis	255
256. Anhang	256
257. Bibliographie	257
258. Zusammenfassung	258
259. Literaturverzeichnis	259
260. Anhang	260
261. Bibliographie	261
262. Zusammenfassung	262
263. Literaturverzeichnis	263
264. Anhang	264
265. Bibliographie	265
266. Zusammenfassung	266
267. Literaturverzeichnis	267
268. Anhang	268
269. Bibliographie	269
270. Zusammenfassung	270
271. Literaturverzeichnis	271
272. Anhang	272
273. Bibliographie	273
274. Zusammenfassung	274
275. Literaturverzeichnis	275
276. Anhang	276
277. Bibliographie	277
278. Zusammenfassung	278
279. Literaturverzeichnis	279
280. Anhang	280
281. Bibliographie	281
282. Zusammenfassung	282
283. Literaturverzeichnis	283
284. Anhang	284
285. Bibliographie	285
286. Zusammenfassung	286
287. Literaturverzeichnis	287
288. Anhang	288
289. Bibliographie	289
290. Zusammenfassung	290
291. Literaturverzeichnis	291
292. Anhang	292
293. Bibliographie	293
294. Zusammenfassung	294
295. Literaturverzeichnis	295
296. Anhang	296
297. Bibliographie	297
298. Zusammenfassung	298
299. Literaturverzeichnis	299
300. Anhang	300
301. Bibliographie	301
302. Zusammenfassung	302
303. Literaturverzeichnis	303
304. Anhang	304
305. Bibliographie	305
306. Zusammenfassung	306
307. Literaturverzeichnis	307
308. Anhang	308
309. Bibliographie	309
310. Zusammenfassung	310
311. Literaturverzeichnis	311
312. Anhang	312
313. Bibliographie	313
314. Zusammenfassung	314
315. Literaturverzeichnis	315
316. Anhang	316
317. Bibliographie	317
318. Zusammenfassung	318
319. Literaturverzeichnis	319
320. Anhang	320
321. Bibliographie	321
322. Zusammenfassung	322
323. Literaturverzeichnis	323
324. Anhang	324
325. Bibliographie	325
326. Zusammenfassung	326
327. Literaturverzeichnis	327
328. Anhang	328
329. Bibliographie	329
330. Zusammenfassung	330
331. Literaturverzeichnis	331
332. Anhang	332
333. Bibliographie	333
334. Zusammenfassung	334
335. Literaturverzeichnis	335
336. Anhang	336
337. Bibliographie	337
338. Zusammenfassung	338
339. Literaturverzeichnis	339
340. Anhang	340
341. Bibliographie	341
342. Zusammenfassung	342
343. Literaturverzeichnis	343
344. Anhang	344
345. Bibliographie	345
346. Zusammenfassung	346
347. Literaturverzeichnis	347
348. Anhang	348
349. Bibliographie	349
350. Zusammenfassung	350
351. Literaturverzeichnis	351
352. Anhang	352
353. Bibliographie	353
354. Zusammenfassung	354
355. Literaturverzeichnis	355
356. Anhang	356
357. Bibliographie	357
358. Zusammenfassung	358
359. Literaturverzeichnis	359
360. Anhang	360
361. Bibliographie	361
362. Zusammenfassung	362
363. Literaturverzeichnis	363
364. Anhang	364
365. Bibliographie	365
366. Zusammenfassung	366
367. Literaturverzeichnis	367
368. Anhang	368
369. Bibliographie	369
370. Zusammenfassung	370
371. Literaturverzeichnis	371
372. Anhang	372
373. Bibliographie	373
374. Zusammenfassung	374
375. Literaturverzeichnis	375
376. Anhang	376
377. Bibliographie	377
378. Zusammenfassung	378
379. Literaturverzeichnis	379
380. Anhang	380
381. Bibliographie	381
382. Zusammenfassung	382
383. Literaturverzeichnis	383
384. Anhang	384
385. Bibliographie	385
386. Zusammenfassung	386
387. Literaturverzeichnis	387
388. Anhang	388
389. Bibliographie	389
390. Zusammenfassung	390
391. Literaturverzeichnis	391
392. Anhang	392
393. Bibliographie	393
394. Zusammenfassung	394
395. Literaturverzeichnis	395
396. Anhang	396
397. Bibliographie	397
398. Zusammenfassung	398
399. Literaturverzeichnis	399
400. Anhang	400
401. Bibliographie	401
402. Zusammenfassung	402
403. Literaturverzeichnis	403
404. Anhang	404
405. Bibliographie	405
406. Zusammenfassung	406
407. Literaturverzeichnis	407
408. Anhang	408
409. Bibliographie	409
410. Zusammenfassung	410
411. Literaturverzeichnis	411
412. Anhang	412
413. Bibliographie	413
414. Zusammenfassung	414
415. Literaturverzeichnis	415
416. Anhang	416
417. Bibliographie	417
418. Zusammenfassung	418
419. Literaturverzeichnis	419
420. Anhang	420
421. Bibliographie	421
422. Zusammenfassung	422
423. Literaturverzeichnis	423
424. Anhang	424
425. Bibliographie	425
426. Zusammenfassung	426
427. Literaturverzeichnis	427
428. Anhang	428
429. Bibliographie	429
430. Zusammenfassung	430
431. Literaturverzeichnis	431
432. Anhang	432
433. Bibliographie	433
434. Zusammenfassung	434
435. Literaturverzeichnis	435
436. Anhang	436
437. Bibliographie	437
438. Zusammenfassung	438
439. Literaturverzeichnis	439
440. Anhang	440
441. Bibliographie	441
442. Zusammenfassung	442
443. Literaturverzeichnis	443
444. Anhang	444
445. Bibliographie	445
446. Zusammenfassung	446
447. Literaturverzeichnis	447
448. Anhang	448
449. Bibliographie	449
450. Zusammenfassung	450
451. Literaturverzeichnis	451
452. Anhang	452
453. Bibliographie	453
454. Zusammenfassung	454
455. Literaturverzeichnis	455
456. Anhang	456
457. Bibliographie	457
458. Zusammenfassung	458
459. Literaturverzeichnis	459
460. Anhang	460
461. Bibliographie	461
462. Zusammenfassung	462
463. Literaturverzeichnis	463
464. Anhang	464
465. Bibliographie	465
466. Zusammenfassung	466
467. Literaturverzeichnis	467
468. Anhang	468
469. Bibliographie	469
470. Zusammenfassung	470
471. Literaturverzeichnis	471
472. Anhang	472
473. Bibliographie	473
474. Zusammenfassung	474
475. Literaturverzeichnis	475
476. Anhang	476
477. Bibliographie	477
478. Zusammenfassung	478
479. Literaturverzeichnis	479
480. Anhang	480
481. Bibliographie	481
482. Zusammenfassung	482
483. Literaturverzeichnis	483
484. Anhang	484
485. Bibliographie	485
486. Zusammenfassung	486
487. Literaturverzeichnis	487
488. Anhang	488
489. Bibliographie	489
490. Zusammenfassung	490
491. Literaturverzeichnis	491
492. Anhang	492
493. Bibliographie	493
494. Zusammenfassung	494
495. Literaturverzeichnis	495
496. Anhang	496
497. Bibliographie	497
498. Zusammenfassung	498
499. Literaturverzeichnis	499
500. Anhang	500
501. Bibliographie	501
502. Zusammenfassung	502
503. Literaturverzeichnis	503
504. Anhang	504
505. Bibliographie	505
506. Zusammenfassung	506
507. Literaturverzeichnis	507
508. Anhang	508
509. Bibliographie	509
510. Zusammenfassung	510
511. Literaturverzeichnis	511
512. Anhang	512
513. Bibliographie	513
514. Zusammenfassung	514
515. Literaturverzeichnis	515
516. Anhang	516
517. Bibliographie	517
518. Zusammenfassung	518
519. Literaturverzeichnis	519
520. Anhang	520
521. Bibliographie	521
522. Zusammenfassung	522
523. Literaturverzeichnis	523
524. Anhang	524
525. Bibliographie	525
526. Zusammenfassung	526
527. Literaturverzeichnis	527
528. Anhang	528
529. Bibliographie	529
530. Zusammenfassung	530
531. Literaturverzeichnis	531
532. Anhang	532
533. Bibliographie	533
534. Zusammenfassung	534
535. Literaturverzeichnis	535
536. Anhang	536
537. Bibliographie	537
538. Zusammenfassung	538
539. Literaturverzeichnis	539
540. Anhang	540
541. Bibliographie	541
542. Zusammenfassung	542
543. Literaturverzeichnis	543
544. Anhang	544



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555611_0043

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Struktur, allgemeine Eigenschaften, Einteilung und Hitze- stabilität der Staphylokokkenenterotoxine	2
2.2. Vorkommen von enterotoxinogenen Staphylokokken	6
2.2.1. Bei Mensch und Tier	6
2.2.2. In Rohmilch	8
2.2.3. In erhitzter Milch	13
2.3. Durch Milchverzehr bedingte Staphylokokken-Intoxikationen .	14
2.4. Einflüsse auf das Wachstum von Staphylokokken und deren Toxinbildung in Milch	19
2.4.1. Temperatur und Zeit	19
2.4.2. Begleitflora	21
2.4.3. Antibiotika	27
2.5. Nachweisverfahren für Staphylokokkenenterotoxin in Lebens- mitteln	30
3. Eigene Untersuchungen	33
3.1. Material	33
3.2. Methodik	34
3.2.1. Nachweis von koagulasepositiven Staphylokokken	34
3.2.2. DNase-Test	34
3.2.3. Nachweis von Enterotoxinen	35
3.2.3.1. Extraktion in Anlehnung an das Verfahren von REISER et al. (1974)	35
3.2.3.2. Serologischer Nachweis von Enterotoxin A, B, C, D und E	37
3.2.3.2.1. Objektträger-Gel-Diffusionstest nach WADSWORTH (1957)	37
3.2.3.2.2. Modifizierter Ouchterlony-Test (MO-Test) nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975)	37
3.2.3.2.3. Einfach-Gel-Diffusionstest nach OUDIN (1952)	40

3.3. Modellversuche	40
3.3.1. Wiedergewinnungsrate von Enterotoxin B aus pasteurisierter Milch	40
3.3.2. Vermehrung und Enterotoxinbildung von Enterotoxin B-bildenden Staphylokokkenstämmen in Milch bei 37°C	41
3.3.3. Einfluß von Penicillin und Joghurtkulturen auf Staphylokokkenwachstum und Enterotoxinbildungsvermögen in Milch bei 25°C	42
3.3.3.1. Einfluß von Penicillin	42
3.3.3.2. Einfluß von Penicillin und Joghurtkulturen	43
3.4. Ergebnisse	44
3.4.1. Vorkommen von koagulasepositiven Staphylokokken und Enterotoxinen in handelsüblicher Milch	44
3.4.2. Wiedergewinnungsrate von Enterotoxin B aus pasteurisierter Vollmilch	44
3.4.3. Vermehrung und Enterotoxinbildung von Staphylokokken in Milch bei 37°C	45
3.4.4. Einfluß von Penicillin auf Staphylokokkenwachstum und Enterotoxin in Milch bei 25°C	47
3.4.5. Einfluß von Penicillin und Joghurtkulturen auf Staphylokokkenwachstum und Enterotoxinbildung in Milch bei 25°C ..	48
4. Besprechung der Ergebnisse	51
5. Zusammenfassung	61
6. Literatur	65

1. Einleitung

Unter den bakteriell bedingten Lebensmittelvergiftungen stehen Staphylokokkenenterotoxikosen im Vordergrund. Über Milchprodukte, speziell Käse, als Ursache von Vergiftungen wird gelegentlich berichtet, während Trinkmilch diesbezüglich nur eine sehr geringe Bedeutung hat. Allerdings wurde auf die Möglichkeit hingewiesen (TERPLAN und ZAADHOF, 1969; TERPLAN, ZAADHOF und BOBETH, 1971), daß mit enterotoxinogenen Staphylokokken kontaminierte erhitzte oder hemmstoffhaltige Milch aufgrund der Ausschaltung antagonistisch wirksamer Keime gute Voraussetzungen für das Wachstum der Enterotoxinbildner biete.

Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst das Vorkommen von koagulase-positiven Staphylokokken und deren Enterotoxine in verschiedenen handelsüblichen Milchproben untersucht werden, um nach dieser Statuserhebung zu prüfen, inwieweit Gesamtkeimzahl, Lagerungstemperatur, Antibiotika, speziell Penicillin, und Säurewecker die Enterotoxinbildung in verschiedenen mit enterotoxinogenen Staphylokokken kontaminierten Milchsorten beeinflussen können.

2. Literatur

2.1. Struktur, allgemeine Eigenschaften, Einteilung und Hitzestabilität der Staphylokokkenenterotoxine

Zur Bildung der Enterotoxine (so genannt wegen ihrer Wirkung auf den Verdauungstrakt) sind nach allgemeiner Ansicht nur koagulasepositive Staphylokokkenstämme befähigt (EVANS, BUETTNER und NIVEN, 1950; CASMAN, 1965). Von diesen wiederum produziert nur ein Teil Enterotoxin (CASMAN, 1967). Es wurde in wenigen Ausnahmefällen, vermutlich handelte es sich um Mutanten, auch eine Enterotoxinbildung von koagulasenegativen Stämmen nachgewiesen (THATCHER und SIMON, 1956; OMORI und KATO, 1959; BERGDOLL et al., 1967; LACHICA et al., 1969; LOTTER und GENIGEORGIS, 1975; MAYER, 1975; u.a.).

Ein anderes Kriterium, das auch in enger Beziehung zur Enterotoxinbildung zu stehen scheint, ist die Desoxyribonucleasebildung, zu der im allgemeinen koagulasepositive Staphylokokken befähigt sind (LACHICA et al., 1972; ERICKSON und DEIBEL, 1973). Nach TATINI (1975) bilden sowohl enterotoxinogene als auch nichtenterotoxinogene Stämme von *Staphylococcus aureus* eine extrazelluläre hitzestabile DNase. Untersuchungen von MAYER (1975) ergaben, daß alle überprüften enterotoxinpositiven Staphylokokkenstämme hitzestabile DNase produzierten und - abgesehen von einem Enterotoxin-C-Bildner - auch Koagulase. Sie konnte jedoch ebenso wie LACHICA et al. (1969) auch bei koagulasenegativen nicht-enterotoxinbildenden Staphylokokkenstämmen DNase-Bildung feststellen. Vermutlich hatten diese Stämme nach längerer Aufbewahrung das Koagulasebildungsvermögen verloren. Weitere Angaben über Eigenschaften und Nachweis von DNase sind den Arbeiten von ABRAMSON (1972) und MAYER (1975) zu entnehmen.

Die Staphylokokkenenterotoxine sind wasserlösliche einfache Proteine (Polypeptidketten), deren Molekulargewicht zwischen 26.000 und 35.000 liegt (SCHANTZ et al., 1972; BERGDOLL et al., 1973). Sie setzen sich

aus einem relativ hohen Anteil der Aminosäuren Lysin, Asparagin- und Glutaminsäure sowie Tyrosin zusammen und enthalten lediglich ein oder zwei Tryptophan- und zwei Cystinreste (BERGDOLL und ROBBINS, 1973). Die Enterotoxine sind resistent gegenüber proteolytischen Enzymen wie Trypsin, Chymotrypsin, Rennin und Papain. Pepsin inaktiviert sie bei einem pH um 2, aber nicht bei höheren pH-Werten (BERGDOLL, 1970).

Als Proteine sind die Enterotoxine in der Lage, die Bildung von Antikörpern im Organismus zu induzieren und aufgrund spezifisch präzipitierender Antikörper konnten bisher sechs verschiedene Typen differenziert werden. Enterotoxin A (CASMAN, 1960) und B (BERGDOLL et al., 1959) - ursprünglich als Enterotoxin F und E bezeichnet - wurden als erste entdeckt.

Enterotoxin C besitzt zwei Varianten C₁ (BORJA und BERGDOLL, 1967) und C₂ (AVENA und BERGDOLL, 1967), die sich zwar in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden, jedoch nicht in ihrem immunologischen Verhalten (BERGDOLL et al., 1965; HUANG et al., 1967). Als weitere Enterotoxine wurden bisher noch entdeckt Typ D (CASMAN et al., 1967), Typ E (BERGDOLL et al., 1971) und Typ F (BENNETT, 1971).

Die antigene Wirkung der verschiedenen Enterotoxintypen ist von unterschiedlicher Spezifität. Nach BERGDOLL und ROBBINS (1973) unterscheiden sich die Typen A und B am stärksten in ihren immunologischen Eigenschaften, da im Gegensatz zu GRUBER und WRIGHT (1969) sowie JOHNSON et al. (1972) zwischen A und B keine Kreuzreaktionen beobachtet werden konnten.

Hinsichtlich der Neutralisation von B und C bestehen nach GRUBER und WRIGHT (1969), JOHNSON et al. (1972), BERGDOLL und ROBBINS (1973) sowie BERGDOLL et al. (1973) bei diesen beiden Toxinen ähnliche antigene Determinanten. Weitere Kreuzreaktionen wurden von BERGDOLL et al. (1971) und BERGDOLL und ROBBINS (1973) zwischen E und A bzw. B beschrieben.

Einige Enterotoxintypen unterscheiden sich auch hinsichtlich der Phase ihrer Bildung. So halten MARKUS und SILVERMAN (1970) Enterotoxin A für ein primäres Stoffwechselprodukt, das hauptsächlich während der logarithmischen Wachstumsphase der Staphylokokken freigesetzt wird. Enterotoxin B wird als sekundäres Stoffwechselprodukt angesehen (McLEAN et al., 1968; MARKUS und SILVERMAN, 1969 und 1970; MORSE et al., 1969), das vor allem gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase bzw. zu Beginn der stationären Phase gebildet wird.

Die größten Enterotoxinmengen werden von Typ B-Stämmen produziert, gefolgt von Typ C-Stämmen (BERGDOLL, 1972). So werden bei bestimmten B-Stämmen in Kulturflüssigkeiten Toxinkonzentrationen bis zu ca. 350 mcg/ml beobachtet (REISER und WEISS, 1969), bei C-Bildnern mehr als 60 mcg/ml, während bei A-Stämmen die Konzentrationen im allgemeinen bei 5 - 6 mcg/ml liegen (CHU et al., 1966; REISER und WEISS, 1969; SCHANTZ et al., 1972), in Ausnahmefällen 57 - 100 mcg/ml FRIEDMAN und HOWARD, 1971; ROBERN et al., 1975). Nach SUGIYAMA et al. (1960) variiert jedoch die Enterotoxinbildung eines Toxin B-bildenden Staphylokokkenstammes von Kolonie zu Kolonie sehr stark. BERGDOLL et al. (1973) beobachteten Unterschiede von 0 - 200 mcg/ml. Ähnliche Ergebnisse waren bei Enterotoxin C-bildenden Stämmen zu verzeichnen. Die Autoren konnten auch feststellen, daß bei Enterotoxin B- und C-bildenden Stämmen nach mehreren Kulturpassagen und Überimpfungen eine erhebliche Abnahme der Toxinproduktion möglich ist. Im Gegensatz hierzu beobachteten FRIEDMAN und HOWARD (1971), daß die Toxinmenge bei A- und E-Bildnern von Kolonie zu Kolonie ziemlich einheitlich ist, ebenso wie bei Enterotoxin D-bildenden Stämmen (BERGDOLL et al., 1973). Ein Staphylokokkenstamm kann auch die Fähigkeit besitzen, zwei verschiedene Enterotoxintypen zu bilden, wobei meist ein Typ überwiegt (BERGDOLL, 1972).

Eine weitere im Hinblick auf diese Arbeit wichtige Eigenschaft der Enterotoxine ist - im Gegensatz zu den Staphylokokken selbst - die extrem hohe Hitzestabilität. Dies zeigten unter anderem Versuche von

READ und BRADSHAW (1966). Sie erhitzten gereinigtes Enterotoxin B (99% Reinheit) mit einer Ausgangskonzentration von 30 mcg/ml in Rohmilch (pH 6,4 - 6,6) bei Temperaturen von 98,9°C bis 122,6°C. Um die zugesetzte Menge Enterotoxin bei diesen Temperaturen bis zur Nachweisgrenze von 0,5 mcg/ml zu inaktivieren, wurden 134 bis 12 Minuten benötigt. Aus den Ergebnissen wurden D- und F-Werte errechnet. Um das Toxin so weit zu inaktivieren, daß beim Menschen, der eine durchschnittliche Menge Milch verzehrt, keine Enterotoxinvergiftung hervorgerufen werden kann, wurde von den Autoren ein vierfacher D-Wert als ausreichend erachtet, was bei den genannten Temperaturen Erhitzungszeiten zwischen 274 und 25 Minuten entspricht. Nach Ansicht der Autoren ist die Inaktivierung von Enterotoxin B durch die übliche Pasteurisierung der Milch nicht gewährleistet. Selbst in Sterilmilch ist nach ihrer Meinung noch mit Enterotoxinmengen zu rechnen, welche eine emetische Wirkung auslösen können. Die Hitzeresistenz anderer Enterotoxintypen sowie ihre Thermostabilität in verschiedenen Medien sind von TERPLAN und ZAADHOF (1974) sowie von KUHN (1974) referiert worden.

Abschließend sei hier noch auf die Erscheinungen der Staphylokokken-enterotoxikosen und deren auslösende Dosis eingegangen. Nach BERGDOLL (1970, 1972) treten die Symptome bereits nach einer Inkubationszeit von 1 - 6 Stunden nach dem Verzehr des enterotoxinhaltigen Nahrungsmittels auf. Die beiden wichtigsten Merkmale sind Erbrechen und Durchfall. Die anderen Symptome wie Schweißausbruch, Unwohlsein und Krämpfe, in schweren Fällen noch Fieber und Blutdruckabfall, können je nach Konstitution und Veranlagung des einzelnen mehr oder weniger stark ausgeprägt sein. Die Krankheit verläuft akut und ist in der Regel ohne ärztliche Behandlung nach 24 bis 72 Stunden beendet (ANGELOTTI, 1969). Als auslösende Dosis hatte ANGELOTTI (1969) bei einem Verzehr von mindestens 100 g Lebensmittel 1 - 5 mcg in Betracht gezogen. BERGDOLL (1969) glaubt aufgrund von Versuchen mit enterotoxinhaltigem Käse (Typ A), daß 0,015 mcg Enterotoxin/kg Körpergewicht ausreichen, um die Symptome hervorzurufen.

2.2. Vorkommen von enterotoxinogenen Staphylokokken

2.2.1. Bei Mensch und Tier

Die Staphylokokken sind ubiquitär und in Luft und Staub ebenso zu finden wie in Wasser, Milch, Nahrungsmitteln, Faeces und Abwässern (BRYAN, 1968; ANGELOTTI, 1969). In der Luft können sie sowohl an Staubpartikelchen wie an kleinen Feuchtigkeitstropfen haften und überleben (MINOR und MARTH, 1972). Sie werden auch durch Fliegen, in deren Darmtrakt sie bis zu einer Woche persistieren können, übertragen (MOOREHEAD und WEISER, 1946). Ihre Hauptreservoirs sind die Schleimhäute des Nasen-Rachenraumes und die Haut von Mensch und Tier. Speziell die Nase ist einer ihrer Hauptbesiedelungs- und Vermehrungsorte (ANGELOTTI, 1969; MINOR und MARTH, 1972; SHEIKH und LUEDECKE, 1974). PULVERER (1965) fand bei 45% von 222 untersuchten Personen koagulasepositive Staphylokokken auf den Nasenschleimhäuten, bei 33,3% auf der Rachenschleimhaut und bei 23,4% auf der Hautoberfläche (Hände).

Nach CASMAN (1965) sowie CASMAN et al. (1967), TERPLAN (1967), TERPLAN und ZAADHOF (1969), UNTERMANN und SINELL (1970) und UNTERMANN (1972a) kommen unter aus Kuhmilch isolierten koagulasepositiven Staphylokokkenstämmen Enterotoxinbildner seltener vor als beim Menschen. HAJEK und MARSALEK (1973) untersuchten das Vorkommen von enterotoxinogenen *Staphylococcus aureus*-Stämmen bei Wirten verschiedener Spezies. Dabei bildeten 38% von 53 Stämmen aus dem oberen Respirationstrakt gesunder Personen Enterotoxin sowie 28% von 47 Humanstämmen, die von verschiedenen Haustieren isoliert wurden. Von 491 Tierstaphylokokken waren dagegen nur sechs Stämme (1%) enterotoxigen. MAYER (1975) konnte bei 45 von 297 bovinen Staphylokokkenstämmen und bei 17 von 143 humanen Stämmen eine Enterotoxinbildung nachweisen, wobei unter den humanen Stämmen hauptsächlich Typ E-Bildner vorkamen, während unter den bovinen Enterotoxin D- und A-Bildner am häufigsten vertreten waren.

Wie hoch die Zahl der Staphylokokkenträger in lebensmittelverarbeitenden Betrieben ist, überprüfte UNTERMANN (1972b). Er konnte bei 99 (37%) von

268 untersuchten Personen aus verschiedenen Lebensmittelbetrieben durch Nasen- und Rachenabstriche koagulasepositive Staphylokokken nachweisen. Von den 118 isolierten Stämmen erwiesen sich 22 (18%) als Enterotoxinbildner. Sechs Stämme produzierten Toxin A, vier Toxin B, neun Toxin C, einer Toxin A und B sowie zwei Toxin A und C. Der Autor schätzt, daß mindestens 15 bis 20% der Menschen in irgendeiner Form Träger enterotoxinbildender Staphylokokken sind.

Nach BRYAN (1968) sind Staphylokokken regelmäßig in der Umgebung von Menschen zu finden, z.B. auf Handtüchern, Gerätschaften oder Kleidung. Eine besondere Kontaminationsquelle stellen Personen mit eitrigen Entzündungen, Wunden oder Furunkulose dar (BRYAN, 1968; MÜLLER und STOJANOW, 1971).

Es sei noch bemerkt, daß koagulasepositive Staphylokokken und deren Enterotoxine auch in der Milch stillender Frauen nachgewiesen worden sind. SCHMIDT et al. (1972) konnten aus 200 Milchproben von 100 Wöchnerinnen 96 Staphylokokkenstämme isolieren. Von diesen waren 23 Stämme koagulasepositiv, darunter sieben Enterotoxinbildner. In einer Untersuchung der Milch von Frauen, deren Säuglinge an gastrointestinalen Störungen litten, konnten bei 90 von 215 Fällen koagulasepositive Staphylokokken gefunden werden, von den 73 enterotoxisch waren (BURBIANKA und DLUZIEWSKA, 1971). Noch höher war der Prozentsatz enterotoxinogener Staphylokokken in Milch von Müttern, die in ärztlicher Behandlung waren; von 73 Stämmen produzierten 68 (93,2%) Enterotoxin A, B oder C, und zwar vorwiegend Typ B (BURBIANKA et al., 1973). Weitere Angaben über das Vorkommen von enterotoxinogenen Staphylokokken beim Menschen sind dem Literaturteil der Arbeit von MAYER (1975) zu entnehmen.

Wie bei vielen anderen Tieren gehören die Staphylokokken bei den Milchtieren ebenfalls zu den Umweltsaprophyten. Sie sind überwiegend auf der Euterhaut, den Hinterschenkeln, der Schwanzgegend und im Darm der Rinder

und somit auch in der Milch zu finden (OBIGER, 1960). SCHULTZE (1967) konnte bei 46 von 100 Tupferproben (Abstrichen), die er von Euter- und Zitzenhaut, Nasenöffnung, Perineum, Melkbechern und Melkerhänden nahm, koagulasepositive Staphylokokken ermitteln. Alle 46 positiven Proben stammten von der Euter- und Zitzenhaut. Vergleichende Untersuchungen von NOLTING (1968) über das Vorkommen von Micrococcaceae in klinisch gesunden Rindereutern, auf Euterhaut und der übrigen Körperoberfläche ergaben weiterhin, daß Staphylokokken häufiger noch aus dem Eutersekret isoliert werden konnten als von den anderen Stellen. TERPLAN und ZAADHOF (1969) konnten in hygienisch gut geführten Großbetrieben unter den klinisch gesunden Tieren ca. 40% Staphylokokkenausseider feststellen, in Kleinbetrieben nur ca. 10%. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich ebenfalls, daß im Eutersekret von den isolierten Micrococcaceae die Staphylokokken mit einem Anteil von 88,6% überwogen und nur 21,5% aus der Umgebung (Zitzenkuppe, Haut, Stallmilieu) isoliert wurden.

2.2.2. In Rohmilch

Die Staphylokokken sind weit verbreitete Mikroben im Milieu der Milchkühe und selbst bei guter Melkhygiene ist die Kontamination der Milch nicht zu vermeiden (SEELEMANN et al., 1963). Als Kontaminationsquellen sind u.a. die Tiere selbst, die Umgebung sowie die Melkutensilien in Betracht zu ziehen (GALESLOOT und STADHOUDERS, 1968; GRÜN, 1968).

Über das Vorkommen von koagulasepositiven bzw. enterotoxinogenen Staphylokokken in Rohmilch wurde schon öfter berichtet (Übersicht 1). MINETT (1938) konnte im Kätzchentest bei 38 Staphylokokkenstämmen aus Milch klinisch gesunder Tiere sowie aus Mastitismilch 16 Enterotoxinbildner feststellen. Bei Untersuchungen von BELL und VELIZ (1952) erwiesen sich im biologischen Nachweis 25 von 37 aus dem Euter isolierten Stämmen als enterotoxinogen. WORSECK (1960) isolierte bei 22 Rohmilchproben aus Verkaufsbehältern Berliner Abmelkbetriebe 650 Staphylokokkenstämme. Von diesen waren 16,7% koagulasepositiv,

sieben Stämme zeigten ein positives Ergebnis im Kätzchentest. Von OBIGER (1961) konnten im biologischen Nachweis von 56 Stämmen neun Enterotoxinbildner nachgewiesen werden. Aus 39 Rohmilchproben konnten CLARK et al. (1961) 62 koagulasepositive Staphylokokkenstämme humanen und bovinen Ursprungs isolieren. Sechs dieser Stämme wurden im Kätzchentest auf Enterotoxin geprüft, wobei es bei einem Stamm zu einer positiven Reaktion kam.

CHERNEVSKI (1963) berichtete aus Bulgarien, daß bei 2406 Milchproben von 609 Kühen 43 pathogene Staphylokokkenstämme festgestellt werden konnten, von denen zwei Enterotoxin produzierten.

In der UdSSR fand OSTAHEVSKI (1966) 101 hämolytische Staphylokokkenstämme in der Milch zweier Farmen und berichtete, daß 34 Stämme im Kätzchentest positiv reagierten. Aus Milch von Kühen mit subklinischen Mastitiden konnten bei 33,3%, in Milchproben von klinisch gesunden Tieren bei 12,3% enterotoxinogene Staphylokokken nachgewiesen werden.

CASMAN (1965) konnte durch eine serologische Überprüfung von 190 Rohmilchproben sechs A- (3,2%) und zwei B-toxinogene Stämme (1%) nachweisen. Unter den aus Mastitismilch gezüchteten 50 Stämmen fand er dagegen keine Enterotoxinbildner. Die Untersuchungen erstreckten sich allerdings nur auf die Toxine A und B. Bei einer weiteren Prüfung (1967), welche auch die Toxine C und D einschloß, konnte er unter 236 aus roher Milch isolierten Stämmen bei 6% Typ D, 1% Typ A, 0,8% Typ B und jeweils 0,4% Typ C und die Kombinationen AC, AD und CD feststellen. Von 51 Stämmen aus Mastitismilch konnten nur 2% Enterotoxin, und zwar D produzieren. TERPLAN und ZAADHOF (1969) untersuchten 1763 Viertelgemelksproben von 442 Kühen aus fünf Großbeständen. Berücksichtigt wurden nur Tiere mit klinisch gesunden Eutervierteln und grobsinnlich unveränderter Milch. In 290 (16,5%) Proben bzw. bei 183 (41,4%) Tieren konnten sie koagulasepositive Staphylokokken feststellen. Von 101 isolierten koagulasepositiven Stämmen bildeten drei

Übersicht 1: Häufigkeit von Enterotoxinbildnern unter aus Rohmilch und Mastitissekret isolierten koagulasepositiven Staphylokokken

Autoren	Anzahl der Proben	Anzahl der Stämme aus Rohmilch Mastitissekret	Enterotoxinbildner (%)	Typen bzw. Nachweisverfahren
MINETT (1938)	-	23	42,1	biol.
BELL und VELIZ (1952)	-	37	67,5	biol.
WORBECK (1960)	22	650	1	biol.
OBIGER (1961)	-	56	16	biol.
CLARK et al. (1961)	39	62	1*)	biol.
CHERNEVSKI (1963)	2406	43	4,6	biol.
CASMAN (1965)	-	190	4,2	A, B
CASMAN (1965)	-	0	0	0
OSTAEVSKI (1966)	-	0	30,9	biol.
CASMAN et al. (1967)	-	236	9,4	A, B, C, D, AC, AD, CD
CASMAN et al. (1967)	-	0	2	0
TERPLAN und ZAACHOF (1969)	1763	101	8,7	A, B, C, D, AB
OLSON et al. (1969)	-	0	10,5	C, D, CD

*) von sechs geprüften Stämmen

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Übersicht 1

Autoren	Anzahl der Proben	Anzahl der Rohmilch	Enterotoxin- bildner (%)	Enterotoxin- bildner (%)	Typen bzw. Nachweisverfahren
UNTERMANN (1969)	-	32	0	6,2	A, B
OLSON et al. (1970)	-	0	157	14,6	C, D, CD
TERPLAN et al. (1971)	-	136	0	9,6	A, B, C, D, AB
SCHMIDT et al. (1972)	545	42	0	14,2	biol.
UNTERMANN et al. (1973)	-	28	0	3,6	C
UNTERMANN et al. (1973)	-	0	92	4,3	C
JAKUBICZ et al. (1973)	-	158	0	7,6	A

Zeichenerklärung: - = nicht bekannt; biol. = biologischer Nachweis

Enterotoxin A, zwei Enterotoxin B und einer beide Toxine. Von 74 dieser 101 Stämme produzierte einer Enterotoxin C, von 78 einer Enterotoxin D.

OLSON et al. (1969) fanden unter 123 Stämmen, die aus Milch an Mastitis erkrankter Tiere gewonnen wurde, 13 Enterotoxinbildner: zehnmal Typ C, zweimal Typ D und einmal Typ CD. Eine weitere Untersuchung (1970) von 157 Stämmen, ebenfalls von akuten Mastitisfällen und teils von chronischen Mastitiden, ergab 23 Enterotoxinbildner (13%): C-Toxin 11 Stämme, D-Toxin 11 Stämme, CD-Toxin ein Stamm. Die Enterotoxine A bzw. B konnten nicht nachgewiesen werden. UNTERMANN (1969) registrierte bei 32 aus Milch isolierten Stämmen je einen A- und B-, jedoch keinen C-Bildner. Das Vorkommen von Enterotoxin D wurde nicht geprüft. GHOSH et al. (1970) konnten unter 320 Staphylokokkenisolaten aus Milch und Milchprodukten nur 29 enterotoxinogene Stämme nachweisen, wobei 1,2% aus Einzelmilchproben von Rindern und Büffeln und 3,2% aus Sammelmilch isoliert worden waren. Die Enterotoxin A und B sowie AB wurden identifiziert. TERPLAN et al. (1971) untersuchten das Enterotoxinbildungsvermögen von 136 koagulasepositiven und 24 koagulase-negativen Staphylokokkenstämmen, die aus Viertelgemelken, Anlieferungsmilch und im Handel befindlicher roher Trinkmilch isoliert worden waren. 13 (9,6%) der getesteten 136 Stämme produzierten Enterotoxin, während bei den 24 koagulase-negativen Stämmen ein solcher Nachweis nicht gelang. Der Anteil der einzelnen Typen war folgender: A 2,2%, B 1,5%, C 0,7%, D 3,7%, AB 1,5%. SCHMIDT et al. (1972) konnten aus 545 Vorzugsmilchen 42 (7,7%) Staphylokokkenstämme züchten. Davon waren 22 (52,4%) koagulasepositiv und sechs erwiesen sich als enterotoxinogen. 1973 wurden von UNTERMANN und Mitarbeitern aus Einzelgemelksproben von 120 Kühen aus 92 verschiedenen Rinderbeständen 120 Staphylokokkenstämme isoliert, von denen fünf Stämme Enterotoxin C bildeten. Enterotoxin A- und B-Bildner waren nicht nachweisbar. JAKUBICZ et al. (1973) konnten bei 158 Stämmen 7,6% A-Bildner feststellen. Die Untersuchungen erstreckten sich auf die Typen A und B.

2.2.3. In erhitzter Milch

Da Staphylokokken die Pasteurisierung nur in seltenen Fällen überleben, ist eine Vermehrung von Staphylokokken in Trinkmilch im wesentlichen nur dann in Betracht zu ziehen, wenn diese durch menschliche Ausscheider kontaminiert wird (WALKER und HARMON, 1963; ZOTTOLA und JEZESKI, 1963; ABO-ELNAGA, 1966; TERPLAN, 1969; ZOTTOLA et al., 1969). Untersuchungen von SCHURR (1970) zeigten, daß von 136 aus Rohmilch isolierten, koagulasepositiven, enterotoxinbildenden Staphylokokkenstämmen 24 teils unter Bedingungen der Kurzzeiterhitzung im Modellversuch überlebten. Bei diesen trat jedoch eine starke Reduzierung auf, so daß ca. 99% der Staphylokokken abgetötet wurden. SHEIKH und LUEDECKE (1974) konnten durch Erhitzen von roher, keimarmer Milch bzw. Sterilmilch auf ungefähr 63°C für 30 Minuten sämtliche inokulierte koagulasepositive bzw. enterotoxinogene Staphylokokken abtöten. Es wurde jedoch auch von einigen Autoren nachgewiesen, daß Staphylokokken in Milch Temperatureinwirkungen von ca. 60°C über 20 Minuten und länger überlebten (CHALLINOR et al., 1943; MYHR und OLSON, 1956; JACKSON und WOODBINE, 1963; DABBAH et al., 1971).

Vom Nachweis enterotoxinbildender Staphylokokken in pasteurisierter Milch berichteten CHALLINOR et al. (1943). Sie überprüften 20 Proben pasteurisierter Milch. Bei 18 von 49 isolierten Stämmen untersuchten sie das Enterotoxinbildungsvermögen im Kätzchentest und fanden dabei drei Toxinbildner.

2.3. Durch Milchverzehr bedingte Staphylokokken-Intoxikationen

Über die Anwesenheit von Staphylokokkenenterotoxinen in Milch bzw. durch Milch bedingte Staphylokokken-Intoxikationen wurde vor allem in früheren Jahren berichtet, wobei unerhitzte und ungekühlte Milch eine entscheidende Rolle spielte.

Die erste Beschreibung eines Falles stammt von BARBER (1914). Auf einer Farm auf den Philippinen kam es während der Jahre 1909 bis 1913 wiederholt zum Auftreten akuter Gastroenteritiden. Diese Erscheinungen zeigten sich meist nach dem Genuß von süßem Rahm. Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, daß eines der Rinder Staphylokokken mit der Milch ausschied. Nachforschungen ergaben, daß frisch gewonnene Milch (der Autor trank selbst davon) nach sofortigem Genuß zu keinen Symptomen oder Erscheinungen führte. Erst wenn die Milch trotz vorhergehender Abkühlung noch circa 5 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde, kam es nach der Aufnahme der Milch bzw. des Rahmes in kurzer Zeit zu den bekannten Krankheitssymptomen. Dadurch erklärt sich auch die Tatsache, daß es immer nur während der warmen Jahreszeit zu den Erkrankungen kam. Die in der Milch vorhandenen enterotoxinbildenden Staphylokokken konnten sich bei den Temperaturen während der Monate März bis Juli (28 - 30°C) so stark vermehren, daß es zu einer ausreichenden Toxinbildung kam. Diese war in der frisch gewonnenen Milch noch nicht ausreichend für eine Intoxikation. Versuche des Verfassers im Labor mit der Milch des verdächtigen Tieres führten bei Freiwilligen zu demselben Ergebnis. Tierversuche mit Katzen und Affen verliefen negativ.

RAMSEY und TRACY (1930) sowie TANNER und RAMSEY (1932) beschrieben den Fall einer Staphylokokkenlebensmittelvergiftung, die sich in ihrem eigenen Labor zutrug. Bei der Untersuchung einer Rohmilchprobe auf malzigen Geschmack überimpften sie einen aus dieser Probe gezüchteten Stamm von Staphylokokken auf eine andere Rohmilchprobe. Nachdem einer von beiden von dieser Probe gekostet hatte, stellten sich bei ihm die typischen Symptome ein. Bei einigen anderen Personen, welche daraufhin ebenfalls von dieser Probe kosteten, kam es zu denselben Erscheinungen. Im Tierversuch kam es bei Katzen zu einem positiven Ergebnis, wohingegen bei Affen bis auf eine Ausnahme keine Krankheitsanzeichen zu erkennen waren.

CRABTREE und LITTERER (1934) berichteten ausführlich über eine Serie (sieben) akuter Gastroenteritiden, die sich in der Zeit vom 27. Juli bis zum 20. Oktober 1933 auf einer Schule in Cumberland County, Tennessee, ereigneten. Insgesamt erkrankten 242 Personen, einige davon mehrmals hintereinander. Da die bekannten Symptome immer nach den Mahlzeiten auftraten, wurden alle Lebensmittel sowohl chemisch als auch bakteriologisch überprüft. Dabei konnten aus der Milch, ebenso wie aus dem Erbrochenen, hämolytische Staphylokokken isoliert werden, deren Filtrate bei allen Versuchen mit Freiwilligen zu dem typischen Krankheitsbild führten. Als Ursache ergab sich, daß zwei Kühe, welche an einer chronischen Staphylokokkenmastitis litten, die Erreger massiv mit der Milch ausschieden. Die Milch der Tiere war teilweise zähflüssig, fadenziehend und enthielt Blut- und Eiterzellen. Die Temperatur im Kühlraum, in welchen die Milch nach dem Melken gebracht wurde, erwies sich als zu hoch. Dort verblieb sie meistens einen Tag bzw. eine Nacht bis zu ihrem Genuß oder ihrer Verarbeitung zu anderen Milchprodukten. Während dieser Lagerung war es offensichtlich zur

Vermehrung der Staphylokokken und deren Enterotoxine gekommen, da dieselbe Milch bei besserer Kühlung und Aufbewahrung keine Intoxikationserscheinungen hervorrief.

SCHMIDT (1936) beschrieb einen Fall einer Lebensmittelvergiftung durch Ziegenmilch. Eine Familie von vier Personen erkrankte zwei bis zweieinhalb Stunden nach dem Genuß von Gersten-Malzkaffee mit erwärmter Ziegenmilch vom Vorabend. Neben den typischen Symptomen zeigten sich in zwei Fällen tetanische Muskelkrämpfe und Kollapszustände bei einem Kind sowie Taubheit. Bei dem Tier wurde eine hoch akute Mastitis festgestellt, begleitet von Fieber und Appetitlosigkeit. Die beiden Lämmer der Ziege verendeten 24 bzw. 48 Stunden nach der Geburt. Die bakteriologische Untersuchung der Ziegenmilch ergab in hohem Maße Staphylokokken. Der Nachweis von Enterotoxin wurde nicht durchgeführt.

SHAUGHNESSY und GRUBB (1936) berichteten von einem Ausbruch akuter Gastroenteritiden auf einer Farm, bei welchem 25 Personen erkrankten. Rohmilch und aus ihr hergestelltes Speiseeis waren die Träger von Staphylokokkenenterotoxinen. Die Milch wurde von drei Rindern, welche an einer subklinischen Mastitis litten, gewonnen, luftgekühlt aufbewahrt und nach mehreren Stunden in ungekochtem Zustand getrunken oder zu Speiseeis verarbeitet. Sowohl in dieser als auch in aseptisch gewonnener Milch der drei Kühe wurden hämolytische Staphylokokken nachgewiesen, von denen mindestens ein Stamm Enterotoxin bildete.

Ein weiterer Fall wird von WEED et al. (1943) beschrieben. Hier starben zwei Kleinkinder bereits 24 Stunden nach Aufnahme von jeweils einem Viertel Liter roher Ziegenmilch. Das fragliche Tier war an einer eitrig-abszedierenden Mastitis erkrankt. Der Nachweis von *Staphylococcus aureus* sowie der Katzentest verliefen positiv.

HAUGE (1951) berichtete von einer Staphylokokkenvergiftung von zwölf Personen nach dem Genuß eines Kartoffelbräus. Als Ursache wurde unpasteurisierte Milch eines mit Mastitis behafteten Rinderbestandes ermittelt.

STEEDE und SMITH (1954) berichteten über eine Erkrankung von zwei Personen nach dem Genuß von selbst hergestelltem Rahm aus Magermilch. Die Milch wurde vor ihrer Verarbeitung sechs Stunden in der Speisekammer bei warmem Wetter (Mai) gelagert. Bemerkenswert war, daß derselbe Staphylokokkenstamm, welcher die Euterentzündung des Rindes hervorrief, auch aus der Nase des Melkers isoliert werden konnte und die charakteristischen Merkmale jenes Stammes mehr für einen humanen Ursprung sprachen.

HAMMER (1956) beschrieb eine Gruppenerkrankung von fünf Personen nach der Aufnahme von Ziegenmilch, die über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde. Die Milch stammte von einer Ziege, die nachweislich an einer akuten hämorrhagischen Mastitis erkrankt war und drei Tage nach Auftreten der ersten Krankheitserscheinungen verendete. Als Ursache der Intoxikation wurde eine starke Kontamination der Milch mit toxinbildenden Mikrokokken erkannt.

STEEDE und IREDALE (1962) berichteten über eine Lebensmittelvergiftung von zwölf Personen in einem Camp der Royal Air Force nach dem Genuß von Rohmilch, die mit *Staphylococcus aureus* infiziert war. Im übrigen handelte es sich hier um dieselben Ursachen wie in den bisher aufgezählten Fällen (zu geringe Abkühlung der Milch, Stehenlassen bei Zimmertemperatur usw.).

Den ersten Ausbruch akuter Gastroenteritiden durch erhitzte Milch beschrieb HACKLER (1939). In Oklahoma wurden 29 Personen aus elf verschiedenen Wohnsitzen in Mitleidenschaft gezogen. Aus den krankheitsverursachenden Milchproben, die in der Molkeerei ordnungsgemäß erhitzt wurden, konnten toxinbildende Staphylokokken isoliert

werden. Als vermutliche Kontaminationsquelle wurden fünf Angestellte des Milchbetriebes in Betracht gezogen, bei denen in Nasen- und Rachenabstrichen enterotoxinogene Staphylokokken nachgewiesen wurden. Eine der Personen hatte außerdem noch Pusteln an Händen und Körper.

Eine weitere Staphylokokkenenterotoxikose durch pasteurisierte Milch wurde von CAUDILL und MEYER (1943) beschrieben. Nach ABO-ELNAGA (1965) soll jene Milch bei 24,4°C gelagert worden sein.

Von einem Fall, bei welchen die im eigenen Haushalt erhitzte Milch zu einer Gastroenteritis führte, berichtete DRYSDALE (1950) aus dem Sudan. In Khartoum erkrankten im September 1947 insgesamt 75 Personen, nachdem sie Kaffee mit erhitzter Milch zu sich genommen hatten. Alle erkrankten Personen hatten ihre Milch von einem Händler auf dem Markt bezogen. Die bakteriologische Untersuchung übriggebliebener Proben ergab keinen Nachweis von Staphylokokken. Im Affenfütterungstest zeigten sich jedoch bei den Tieren die bekannten Anzeichen einer Enterotoxinvergiftung. Durch weitere Nachforschungen konnte festgestellt werden, daß in einer Ziegenherde, aus welcher u.a. die Milch bezogen wurde, ein Tier eine Euterentzündung hatte. Vergleichende Untersuchungen der beiden Staphylokokkenstämme (aus der Rohmilch und vom Ziegeneuter) ergaben zwar dieselbe Phagentypisierung, der Tierversuch verlief jedoch negativ.

Eine durch Milch verursachte Endemie bei Schulkindern beschrieb WARNING (1953). Es erkrankten insgesamt 285 Kinder nach dem Genuß einer Milch, die wahrscheinlich vor der Pasteurisierung kontaminiert worden war.

2.4. Einflüsse auf das Wachstum von Staphylokokken und deren Toxinbildung in Milch

In der Milch kann es nur beim Zusammentreffen mehrerer außergewöhnlicher Umstände zur Enterotoxinbildung kommen. Eine Kontamination der Milch mit enterotoxinogenen Staphylokokken muß nicht Keimvermehrung und noch weniger Enterotoxinbildung nach sich ziehen. Nach TATINI (1973) ist weiterhin die Bildung der Enterotoxine wesentlich enger begrenzt als das Wachstum der Staphylokokken selbst.

2.4.1. Temperatur und Zeit

Einen wichtigen Einfluß auf das Wachstum der Staphylokokken hat die Lagerungstemperatur. Nach MINOR und MARTH (1971) können sich Staphylokokken in einem Temperaturbereich von 10 bis 45°C vermehren, bei einem Optimum von 37°C. Der Temperaturbereich für die Enterotoxinbildung bzw. für das Staphylokokkenwachstum liegt nach TATINI (1973) bei 10 bis 46°C bzw. 7 bis 47,8°C, die Optimaltemperatur zwischen 40 und 45°C bzw. bei 37°C. McLEAN et al. (1968) beobachteten, daß die Toxinbildung eines Typ B-bildenden Staphylokokkenstammes bei gleicher Wachstumsintensität bei niedrigen Temperaturen (16 und 20°C) geringer war als bei höheren (37°C). Eine Verminderung der Enterotoxin A-Bildung in Milch bei 27°C im Vergleich zu 37°C konnten auch PETRUSHINA et al. (1975) feststellen. STOLMAKOVA (1954) fand Enterotoxin nach fünf Stunden bei 35 bis 37°C und nach acht Stunden bei 19 bis 20°C, jedoch nicht bei 5 bis 6°C.

Ausführliche Angaben über den Einfluß der Temperatur auf das Wachstum und die Enterotoxinbildung in künstlichen Nährmedien finden sich in der Arbeit von RICHTER (1974). An dieser Stelle soll lediglich auf die Beeinflussung in Milch näher eingegangen werden.

HEINEMANN (1957) beobachtete, daß sich enterotoxinogene Staphylokokken in roher Magermilch bei einer Temperatur von 26,7°C in zwölf

Stunden nur geringgradig vermehrten. Bei einer Lagerungstemperatur von $15,6^{\circ}\text{C}$ und darunter nahm ihre Zahl ab, ebenso wie bei $51,7^{\circ}\text{C}$ oder noch höheren Temperaturen. $43,3^{\circ}\text{C}$ schienen für die Enterotoxin-A-Bildner am günstigsten zu sein. Bei dieser Temperatur überwucherte jedoch die natürliche Flora schnell die Staphylokokken. JONES et al. (1957) stellten fest, daß bei Temperaturen unter 25°C das Wachstum der Staphylokokken in natürlich infizierter Rohmilch so langsam war, daß sie die Bildung von Enterotoxin innerhalb von 24 Stunden für ausgeschlossen hielten. THATCHER und ROSS (1960) untersuchten die Vermehrungsrate von Staphylokokken, die von klinisch gesunden Rindern mit der Milch ausgeschieden wurden. Es zeigte sich, daß bei 10°C innerhalb von 21 Stunden keine nennenswerte Vermehrung eintrat. Bei Zimmertemperatur ($22 - 25^{\circ}\text{C}$) kam es durchschnittlich nach fünf Stunden zu einer Vermehrung um das Dreifache, nach 21 Stunden um das Tausendfache. In Nachahmung der natürlichen Bedingungen bei nicht ordnungsgemäß gekühlter Milch (Abkühlung von 35 auf 22°C) kam es innerhalb von fünf Stunden zu einem 30fachen und nach 21 Stunden zu einem 6000- bis 10000fachen Anstieg des ursprünglichen Staphylokokkengehaltes.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam MURRAY (1960), der bei einer Rohmilchlagerung von 48 Stunden bei 18°C bzw. 24 Stunden bei 22°C keine nennenswerte Vermehrung der Staphylokokken fand, wohl aber nach 48 Stunden bei 22°C . DONNELLY, LESLIE und BLACK (1968) wiesen in keim- armer roher und pasteurisierter Milch, die jeweils mit 10^4 Staphylokokken/ml beimpft und bei verschiedenen Temperaturen bebrütet wurde, nach 48 - 96 Stunden (20°C) bzw. 12 Stunden (35°C) Enterotoxin A nach.

CLARK und NELSON (1961) beobachteten die Vermehrung von koagulase- positiven Staphylokokken in 20 Vorzugsmilchproben aus Sammel tanks bei 4 und 10°C . In allen Proben waren anfangs ca. $25 - 3300$ Staphylokokken/ml. Während einer siebentägigen Lagerung bei 4°C kam es zu

keiner nennenswerten Vermehrung der Staphylokokken. Wurden dieselben Proben einer Temperatur von 10°C ausgesetzt, so war die Zahl der koagulasepositiven Staphylokokken um das Doppelte angestiegen, in einem Fall kam es sogar zu einer 1000fachen Vermehrung.

Das Wachstum von zwei verschiedenen koagulasepositiven Staphylokokkenstämmen in Voll- und Magermilch bei Temperaturen von 5, 10, 22, 30 und 37°C wurde von WALKER und HARMON (1965) überprüft. In beiden Medien erfolgte bei 5°C ein kontinuierliches Absinken der Keimzahl. Für die Stämme dauerte die logarithmische Wachstumsphase bei 10°C 20 Tage und bei 37°C 12 Stunden. Die Generationsdauer der Stämme war bei 10 und 22°C gleich lang, ebenso bei 30 und 37°C .

Versuche von ABO-ELNAGA und KANDLER (1965) zeigten, daß sich Staphylokokken während einer 24stündigen Lagerung der Milch bei Temperaturen, wie sie bei Anwendung von Wasser oder Solekühlung ($15 - 2,5^{\circ}\text{C}$) erreicht werden, keine deutliche Vermehrung der Staphylokokken eintritt. Auch sie beobachteten eine Abnahme der Keime bei 4°C .

MARSHALL et al. (1966) inokulierten Staphylokokken in sterile rekonstituierte Trockenmagermilch, die 5 Tage lang bei 4°C und -10°C gelagert wurde. Bei 4°C konnten sie eine 52%ige Abnahme der Keimzahl feststellen, jedoch bei -10°C nur eine 3%ige. In aseptisch gewonnener Rohmilch ergaben dieselben Versuche ein ähnliches Ergebnis, jedoch mit einem geringeren Größenunterschied.

2.4.2. Begleitflora

Die Begleitflora der Milch spielt in bezug auf Staphylokokkenvermehrung und Enterotoxinbildung eine wichtige Rolle, da Staphylokokken von anderen Keimarten in der Milch im Wachstum kompetitiv gehemmt werden (TERPLAN, 1969; UNTERMANN, 1969; RENNER, 1974; u.a.), insbesondere von Milchsäurebildnern. So konnte speziell bei der Käse-

herstellung des öfteren beobachtet werden, daß gerade jene Chargen zu Enterotoxinvergiftungen führten, bei denen das Wachstum der Staphylokokken durch Säuerungsträgheit der Milch überhandnehmen konnte (ZEHREN und ZEHREN, 1968).

JONES et al. (1957) bemerkten, daß in Rohmilch bei niederen Temperaturen keine nennenswerte Vermehrung der Staphylokokken eintrat, wenn die Zahl der Milchsäure- und Fäkalstreptokokken genau so groß oder größer war als die Zahl der Staphylokokken. GRAVES und FRAZIER (1963) isolierten aus roher und pasteurisierter Milch mehrere Stämme, die das Wachstum der Staphylokokken hemmten. Bei der Überprüfung in ATP-Bouillon hatten Milchsäurebakterien (Gattung *Streptococcus*, *Leuconostoc* und *Lactobacillus*) den größten Hemmeffekt. Auch *E. freundii* und *E. intermedia* wirken antagonistisch.

REITER et al. (1964) setzten roher und erhitzter Milch (kurzzeit- und hocherhitzt) 1% Starterkultur (*Sc. lactis*) zu und bebrüteten diese 5 Stunden bei 30°C. In Rohmilch ohne Starterzusatz kam es zur Verdoppelung, mit Starter zur Abnahme der Staphylokokken. In kurzzeiterhitzter Milch trat in beiden Fällen geringgradige Vermehrung auf, während in hocherhitzter Milch ohne Starterzusatz eine 70fache, mit Starterzusatz nur eine 3 1/2fache Vermehrung der Staphylokokken beobachtet werden konnte. Über den hemmenden Effekt durch *Streptococcus diacetylactis* wurde wiederholt berichtet (IANDOLO et al., 1965; RADICH et al., 1969; DALY et al., 1972).

KAO und FRAZIER (1966) berichteten, daß ein Teil der Milchsäurebakterien und Fäkalstreptokokken bei Inkubationstemperaturen von 20 - 37°C das Wachstum der Staphylokokken in der Anfangsphase stimulieren. Die meisten Kulturen wirken jedoch hemmend. *Streptococcus faecium* und *Lactobacillus mesenteroides* übten während der maximalen Wachstumsphase sogar einen abtötenden Effekt aus. Bei Temperaturen von 10, 15, 20 und 25°C wirkten Laktobazillen hemmend.

Streptococcus faecalis var. *liquefaciens* zeigte diese Wirkung auch noch bei 30°C und 37°C. Wenn das Verhältnis der Milchsäurebakterien zu den Staphylokokken 100:1 war, verhinderten die Enterokokken bei 15 und 22°C eine Vermehrung der Staphylokokken über 5×10^6 /ml. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei 15°C und bei einem Verhältnis von 1:1 erzielt. Selbst beim Verhältnis von 1:100 zugunsten der Staphylokokken vermehrten sich diese nicht. Im allgemeinen war bei niederen Temperaturen wie 10 oder 15°C der Hemmeffekt am größten.

JEZESKI et al. (1967) fanden ebenfalls, daß beim Vorhandensein von Milchsäurestreptokokken in steriler rekonstituierter Trockenmagermilch Staphylokokken gehemmt und "inaktiviert" werden. Enterotoxin A wurde nach 24, 36 und 72 Stunden nachgewiesen, falls keine Milchsäurebildner anwesend waren oder diese von Bakteriophagen befallen waren. Bei Anwesenheit von *Streptococcus lactis* konnte auch nach 72 Stunden kein Toxin nachweis geführt werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis im gleichen Medium kam auch ZALDUEGUI (1969). REUTER (1972) beobachtete in der logarithmischen Wachstumsphase eine stärkere Hemmung der Staphylokokken durch Streptokokken als durch Laktobazillen, während in der stationären Phase die Laktobazillen in der Hemmung am wirksamsten waren.

RICHARDSON und DIVATIA (1973) inokulierten in sterile rekonstituierte Trockenmagermilch je 10^6 Staphylokokken/ml verschiedener enterotoxinbildender (A, B, C und D) Stämme. Der Zusatz von 0,1% Milchsäurebakterien (speziell Streptokokken) reichte aus, um bei 32°C für 24 Stunden Wachstum und Toxinbildung zu verhindern.

Auch andere Bakteriengattungen wirken antagonistisch auf das Wachstum der Staphylokokken. TROLLER und FRAZIER (1963) untersuchten den Einfluß von *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas* sp. und *Achromobacter* sp. auf einen enterotoxinbildenden Staphylokokkenstamm. Sie

wählten dazu verschiedene künstliche Medien und Temperaturbereiche. In sämtlichen Fällen konnten sie eine Hemmung der Staphylokokken nachweisen, die sich mit dem Anteil der hemmenden Bakterien verstärkte (1:1, 10:1, 100:1). Eine Hemmung durch *E. coli* wurde auch von OBERHOFER und FRAZIER (1961) nachgewiesen. Bei den Beobachtungen von ABO-ELNAGA und KANDLER (1965) über die Vermehrung von Staphylokokken in natürlich kontaminierter Anlieferungsmilch bestand in einer Probe mit der Gesamtkeimzahl 100.000/ml und 2.000 Staphylokokken/ml die dominierende Flora aus *Aerobacter aerogenes*. Bei Temperaturen von 15 und 10°C blieben diese in der Mehrzahl, während die Zahl der Staphylokokken ebenso abnahm wie bei 2,5°C und einer dominierenden *Pseudomonas*-Flora. Den Hemmeffekt von *Coli*- und *Proteus*-Keimen auf das Staphylokokkenwachstum prüften DIGIACINTO und FRAZIER (1966) und stellten fest, daß die Hemmung der Staphylokokken umso größer war, je höher das Anfangsinokulum der "*Coli-Proteus*-Gruppe" und je niedriger die Temperaturen waren (37 bis 10°C). Wenn das ursprüngliche Verhältnis zwischen "*Coli-Proteus*" und Staphylokokken 100:1 betrug, erreichten die Staphylokokken bis auf eine Ausnahme bei 10, 15, 22 oder 30°C die Zahl von 5×10^6 Keimen/ml nicht. Beim Verhältnis von 1:1 und 15°C verzögerten entweder alle Stämme das Wachstum der Staphylokokken oder verhinderten die starke Vermehrung. Einige verursachten eine Wachstumshemmung von zwei bis drei Stunden bei 22°C und nur *Escherichia coli* konnte bei 30°C die Vermehrung der Staphylokokken verzögern. Im allgemeinen verhinderten *E. coli*, *E. freundii* und *Proteus vulgaris* das Wachstum der Staphylokokken am stärksten bei 22 und 30°C.

Untersuchungen von DONELLY et al. (1968) zeigten, daß die Gesamtkeimzahl der Milch für Staphylokokkenwachstum und Enterotoxinbildung wesentlich ist. So konnten die Autoren in Rohmilch mit ca. 10^4 bzw. in pasteurisierter Milch mit ca. 10^3 Keimen/ml, die mit 10^4 bzw. 10^6 Staphylokokken/ml beimpft wurde, Enterotoxin A nach 6- bis 96stündiger Bebrütung bei Temperaturen von 35, 30, 25 und

20°C feststellen. In Rohmilch mit ca. 10^6 Keimen/ml wurde Enterotoxin A erst nach Kontamination mit 10^6 Staphylokokken/ml und auch nur bei Lagerung bei 35°C gefunden. Im allgemeinen enthielten die Milchproben 5 bis 10×10^7 Staphylokokken/ml, wenn Enterotoxin A erstmals nachweisbar war.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch TATINI et al. (1971) in Versuchen mit verschiedenen Milchen. In keimarmer Rohmilch (80/ml) und in steriler rekonstituierter Trockenmagermilch konnte nach Inokulation von 10^3 bis 10^5 Staphylokokken/ml bei Temperaturen von 32 und 37°C bereits nach 4 bis 6 Stunden Enterotoxin A ermittelt werden. Zu diesem Zeitpunkt waren 2 bis 3×10^6 Staphylokokken/ml Milch vorhanden. In Rohmilch mit hoher Gesamtkeimzahl ($1,5 \times 10^5$ bis 9×10^6) konnte trotz relativ hoher Staphylokokkenzahl nur in einer Probe Enterotoxin A gefunden werden. In hitzebehandelter Milch (kurzzeiterhitzt, dauererhitzt, im Dampftopf erhitzt und Sterilmilch) wurde bei gutem Staphylokokkenwachstum nach 12 Stunden Enterotoxin A nachgewiesen. In weiteren Experimenten konnten die Autoren nachweisen, daß die Wachstumshemmung der Staphylokokken in Sammelmilchproben größer war als in Milchproben einzelner Tiere. Die Autoren führten das auf die stärkere Verunreinigung der Sammelmilch mit Escherichia, Achromobacter, Pseudomonas- und Bazillusarten zurück.

GHOSH (1973) inokulierte mehr als 10^5 Staphylokokken/ml in Milchproben mit mehr als 1,5 Mill./ml Gesamtkeimzahl und konnte nach Bebrütung bei 35°C kein Enterotoxin (A oder B) nachweisen. Dies gelang ihm jedoch in Rohmilch mit Gesamtkeimzahlen unter 5×10^6 /ml bei einer Inokulation von 9×10^6 Staphylokokken/ml, ebenso wie in pasteurisierter Milch nach Beimpfung mit 5×10^6 Staphylokokken/ml. Eine Beeinträchtigung der Toxinbildung (A) wurde auch von PETRUSHINA et al. (1975) in Milch mit geringer Staphylokokkenzahl (5.000/ml) und hoher Gesamtkeimzahl (750.000/ml) festgestellt.

Über den Wirkungsmechanismus des Hemmeffektes der verschiedenen Bakterien auf das Staphylokokkenwachstum gibt es unterschiedliche Ansichten. So soll die Bildung antibiotisch wirksamer Substanzen eine Rolle spielen (DIGIACINTO und FRAZIER, 1966; TROLLER und FRAZIER, 1963). Die Senkung des pH-Wertes durch Milchsäure- oder Essigsäureanreicherung wird ebenfalls als Grund angesehen (HAINES und HARMON, 1973; MINOR und MARTH, 1970, 1972 a; TATINI, 1971). Nach MINOR und MARTH (1970) ist die Art der Säure von Bedeutung: Essigsäure hemmt bereits bei pH 5,2, Milchsäure erst bei pH 4,9 das Staphylokokkenwachstum. Weitere antagonistisch wirkende Faktoren sind die Bildung von H_2O_2 (DAHIYA und SPECK, 1968; GILLILAND und SPECK, 1972; HAINES und HARMON, 1973), sowie der Entzug von Nährstoffen, insbesondere gewissen Aminosäuren und Vitaminen (IANDOLO et al., 1965; HAINES und HARMON, 1973; DIGIACINTO und FRAZIER, 1966; TROLLER und FRAZIER, 1963).

Obwohl die meisten Bakterienarten eine Hemmung der Staphylokokken in Lebensmitteln bewirken, wurde auch verschiedentlich von einer Stimulierung durch Begleitkeime berichtet. So haben in Versuchen von GRAVES und FRAZIER (1963) Kulturen von *E. coli*, *Aerobacter*, *Paracolobactrum aerogenoides*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* und Hefen, die aus Lebensmitteln isoliert worden waren, das Wachstum von Staphylokokken in künstlichen Medien bei 25°C stimuliert. Wachstumsfördernde Effekte durch Streptokokken und Laktobazillen wurden 1958 von JUDGE beschrieben. Dieselbe Wirkung sollen auch bestimmte *Candida*-Arten ausüben (EMMANOUILIDOU-ARSENI und SOULTANI, 1960). In Fleisch beobachteten MCCOY und FABER (1966) eine signifikante Stimulierung der Staphylokokken und Toxinbildung durch *B. cereus*.

Auch Bakteriophagen können Wachstum und damit Enterotoxinbildung von Staphylokokken indirekt stimulieren, wenn sie Streptokokken und Laktobazillen befallen (KLUPSCH, 1968) und damit diese Antagonisten weitgehend ausschalten. Dies bestätigen Versuche von JEZESKI et al.

(1967) und von ZALDUEGUI (1970). Sie konnten in Milchproben, die mit *Streptococcus lactis* beimpft worden waren, kein Enterotoxin nachweisen, während in denselben Proben bei Anwesenheit von Bakteriophagen Enterotoxin gefunden wurde.

2.4.3. Antibiotika

Nach Angaben einiger Autoren sollen enterotoxinbildende Staphylokokken eine größere Penicillin- bzw. Antibiotikaresistenz besitzen als Nicht-Enterotoxinbildner. So ermittelten bereits RUTHERFORD und CROWSON (1945) drei Stämme, die durch 10 IE Penicillin kaum gehemmt wurden.

Über die Penicillin- bzw. Antibiotikaresistenz enterotoxinogener Staphylokokken sind mehrere Publikationen erschienen. Eine umfassende Darstellung darüber ist in der Arbeit von MAYER (1975) zu finden.

Die in der Milch befindliche mesophile Bakterienflora ist in der Regel gegen Penicillin und andere Antibiotika empfindlich. Die Empfindlichkeit gegen Penicillin steigt nach SCHULZ (1965) in der Reihe *Sc. cremoris* und übrige Aromabildner, Propionsäurebakterien, *Sc. lactis*, Laktobazillen. Hemmende Konzentrationen sind für *Sc. cremoris* u.a. 0,01 bis 0,1 IE/ml Milch, für Propionsäurebakterien 0,1 IE/ml Milch, für *Sc. lactis* 0,25 bis 0,30 IE/ml Milch und Laktobazillen 2 bis 5 IE/ml Milch. Nach OBIGER (1963) sind *Sc. thermophilus* und *Lb. bulgaricus* noch bis zu 0,01 IE penicillinempfindlich, während *Sc. lactis* und *Sc. cremoris* sowie Laktobazillen auch durch 0,05 IE nicht gehemmt werden.

Nach TERPLAN und ZAADHOF (1967) stammen Antibiotikarückstände in der Milch im wesentlichen aus intramammärer Verabreichung. Aus der umfangreichen Literatur über das Vorkommen von Hemmstoffen in Milch

seien hier lediglich zwei Beispiele aufgeführt. FLABHOFF (1974) konnte mit Hilfe des Agardiffusionstests von 17121 Anlieferungsmilchproben in 5,1% der Proben (868) antibiotisch wirksame Substanzen feststellen. Durch Befragung der Lieferanten hemmstoffhaltiger Milch konnte er in 73,2% der Fälle eine Nichteinhaltung der gesetzlichen Vorschriften während der Ausscheidungsdauer ermitteln. KIERMEIER (1974) konnte in einer Untersuchung von 17005 Milchproben aus 12 Einzugsgebieten 455mal (2,68%) Hemmstoffe nachweisen. Von 192 hemmstoffpositiven Proben enthielten 123 (64,1%) Penicillin. Nach Ansicht des Autors ist die Empfindlichkeit der Milchsäurebildner gegenüber Penicillin um 1 bis 2 Zehnerpotenzen größer als die der Mastitiserreger, und die Grenzkonzentrationen für Milchsäurebakterien liegen bei 0,01 bis 0,1 IE/ml. Da am ersten Tag nach der Behandlung bis etwa 10 IE/ml Milch von einem Tier ausgeschieden werden können, muß z.B. 1 l dieser Milch mit mehr als 100 l einwandfreier Milch vermischt werden, damit die Grenzkonzentration nicht erreicht wird.

Die in der Rohmilch eventuell vorhandenen Antibiotika werden durch die in der Molkerei üblichen Pasteurisierungsverfahren der Kurzzeit- und Hoherhitzung nur geringgradig inaktiviert (BECKER, 1966; HAUKE, 1968; FLABHOFF, 1974). Bei der Sterilisierung der Milch bei 120°C werden die Antibiotika zu 30 bis 60% zerstört (WODSAK, 1959). Eine Übersicht über den Einfluß der Erhitzung auf die Aktivität verschiedener Antibiotika enthält die Arbeit von FLABHOFF (1974).

Abgesehen von der mehr oder minder starken Wirkung von Antibiotika auf das Wachstum von Staphylokokken existieren auch Angaben über die Hemmung bzw. Stimulierung der Enterotoxin B- und A-Bildung. So konnte FRIEDMAN (1966) in künstlichen Medien durch Zusatz von 0,0007 µmol Streptomycinsulfat/ml bzw. 0,009 µmol Chloremphenicol/ml eine 100%ige bzw. 57%ige Hemmung in der Enterotoxinbildung feststellen.

In einer weiteren Untersuchung (1968) registrierte derselbe Autor, daß 0,0056 (= 0,003) bzw. 0,0393 m μ mol/ml (= 0,013 IE/ml) Penicillin G die Toxinbildung des Staphylokokkenstammes S 6 (B-Bildner) zu 13% bzw. 100% hemmte; Methicillin und Ampicillin wirkten ähnlich. Bei dem B-bildenden Stamm 243 (Penicillin- und Ampicillin-resistent) kam es erst bei 0,449 m μ mol Penicillin/ml (= 0,26 IE/ml) zu einer Hemmung der Enterotoxinbildung um 12% ohne Beeinträchtigung des Wachstums. Bei Zusatz von 0,0015 μ mol Methicillin/ml erfolgte zwar eine Wachstumsverzögerung, die Toxinausbeute war jedoch doppelt so groß wie bei der Kontrollprobe ohne Antibiotikum.

Auf einen hemmenden Einfluß auf die Toxinbildung wiesen für Streptomycin ROSENWALD und LINCOLN (1966), für Chloramphenicol MORSE et al. (1969) hin.

Die durch Penicillin ausgelöste Hemmung der Toxogenese, wie sie von FRIEDMAN (1968) festgestellt wurde, konnte von MARKUS und SILVERMAN (1968) bei 100 IE Penicillin G/ml nicht bestätigt werden. Die Verfasser beobachteten außerdem, daß Chloramphenicol und Streptomycinsulfat bei sich nicht mehr vermehrenden Kulturen (B-Bildnern) die Toxinbildung nicht einschränkte. Im Gegensatz dazu wurde die Synthese von Toxin A bei sich nicht mehr vermehrenden Bakterien durch Chloramphenicol gehemmt; Streptomycin und Penicillin G hemmten auch diesen Typ nicht (MARKUS und SILVERMAN, 1970).

Als Grund für die Hemmung der Enterotoxinbildung durch Streptomycin und Chloramphenicol wird die Hemmung der Proteinsynthese angegeben (GALE und FOLKES, 1953; ERDOS und ULLMANN, 1959). FRIEDMAN (1966) nimmt an, daß diese Antibiotika die Durchlässigkeit der Zellwand verändern und damit die Synthese zellulärer Produkte wie Enterotoxin beeinflussen. FRIEDMAN (1968) leitete aus den Ergebnissen außerdem ab, daß die Bakterienoberfläche für die Enterotoxinbildung verantwortlich ist, da die Zellwandsynthese blockierende Verbindungen auch die Enterotoxinbildung hemmten. ROSENWALD und LINCOLN (1966)

nehmen an, daß infolge von Veränderungen der Bakterienzelle kein Enterotoxin freigesetzt wird.

2.5. Nachweisverfahren für Staphylokokkenenterotoxin in Lebensmitteln

Der Nachweis von Enterotoxinen kann entweder aufgrund der antigenen Toxineigenschaften durch immunologische Verfahren oder durch biologische Methoden erfolgen. Den immunologischen Tests liegen vor allem Präzipitations- und Agglutinationsreaktionen zugrunde. Auch fluoreszenzserologische sowie radioimmunologische Methoden werden eingesetzt. Da diese immunologischen Verfahren bereits ausführlich in mehreren Arbeiten (SCHURR, 1970; KUHN, 1974; SOMMERFELD und TERPLAN, 1975; HOLBROOK und BAIRD-PARKER, 1975) beschrieben sind, soll hier nicht näher auf sie eingegangen werden.

Unter den biologischen Methoden fanden in erster Linie der Affenfütterungstest sowie der Kätzchentest Anwendung. Weitere Enterotoxinnachweisverfahren wurden versucht mit Hunden, Kaninchen, Mäusen, Froschspermien, Mikroorganismen u.a. In den letzten Jahren wurde auch der Nachweis über Zellkulturen mit zum Teil unterschiedlichen Erfolgen angewendet. Einzelheiten über die biologischen Nachweisverfahren können den Arbeiten von GANTZE (1976) sowie SOMMERFELD und TERPLAN (1975) entnommen werden.

Für den serologischen Nachweis von Toxinen aus Lebensmitteln ist eine vorhergehende Extraktion und Konzentration sowie die Reinigung der Enterotoxine notwendig. Dazu wurden bisher mehrere Verfahren entwickelt (CASMAN und BENNETT, 1965; HALL et al., 1965; READ et al., 1965 a und b; STOJANOW und SCHENK, 1966, 1970; CASMAN, 1967; ZEHREN und ZEHREN, 1968; BARBER und DEIBEL, 1972; REISER et al., 1974).

Prinzipiell beruhen diese Methoden auf selektiver Adsorption des aus dem Lebensmittel extrahierten Enterotoxins an Ionenaustauscher

bzw. auf selektiver Entfernung störender Lebensmittelbestandteile mittels chemischer und physikalischer Methoden. Die wichtigsten Details der verschiedenen Verfahren sind in der Übersicht 2 dargestellt. Weitere Einzelheiten können den Arbeiten von MEYER (1973), SOMMERFELD und TERPLAN (1975) und GANTZE (1976) sowie den jeweiligen Originalarbeiten entnommen werden.

Die einzelnen Schritte der Methode nach REISER et al. (1974) werden ausführlich im Rahmen der eigenen Untersuchungen (3.2.3.1.) beschrieben.

Übersicht 2: Verfahren zur Extraktion von Staphylokokken-Enterotoxinen aus Lebensmitteln (nach GANTZE, 1976)

Extraktion mit	Konzentrierung mit	Reinigung mit	Elution mit	Konzentrierung mit	Autor
Phosphatpuffer (PB)	-	Amberlite	0,2 m PB	Polyvinylpyrrolidon (PVP)	HALL, ANGELOTTI und LEWIS (1966)
Säure, Chloroform	PVP	Säurefällung, Erhitzen, Chloroformextraktion		-	READ et al. (1965 a, b)
NaCl-Lösung	Polyäthylenglykol (PEG)	CMC	0,2 m NaCl in 0,2 m PB	PEG	CASMAN und BENNETT (1965)
NaCl-Lösung, Chloroform	PEG	CMC ^{*)}	0,2 m NaCl in 0,2 m PB	PEG, Lyophilisation	CASMAN (1967)
NaCl-Lösung	PEG	CMC ^{*)}	0,2 m NaCl in 0,2 m PB	PEG, PEG ^{*)} , Lyophilisation	ZEHRN und ZEHRN (1968)
NaCl-Lösung, Chloroform, Säure	PEG	CMC ^{**)}	0,2 m NaCl in 0,2 m PB	PEG, PEG ^{*)} , Lyophilisation	BARBER und DEIBEL (1972)
Säure, Chloroform	-	Amberlite	0,9% NaCl in 0,15 m Na ₂ HPO ₄	PEG ^{***)}	REISER, DONAWAY und BERGDOLL (1974)
Na ₂ HPO ₄ , Erhitzen, Säurepräzipitation	Bio-Gel P 10	Sephadex oder Bio-Gel	0,02 m Na ₂ HPO ₄	Bio-Gel	STOJANOW und SCHENK (1966, 1970)

^{*)} nach vorheriger Chloroformextraktion

^{**)} nach vorheriger Chloroformextraktion, Säurezusatz und Erhitzen

^{***)} zuvor Reinigung über Agar, danach Chloroformextraktion, Lyophilisation und Behandlung mit Trypsin.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material

55 handelsübliche Milchproben wurden auf die Anwesenheit von koagulase-positiven Staphylokokken sowie auf die Enterotoxine A, B, C, D und E untersucht. Über Art und Zahl der untersuchten Proben gibt Tabelle 1 Auskunft.

Tabelle 1: Art und Zahl der untersuchten Milchen

Art der Milchen	Anzahl
Vollmilch, pasteurisiert	30
Teilentrahmte Milch, pasteurisiert	10
Vorzugsmilch	10
Ultrahocherhitzte Milch	5

Die erhitzte Milch stammte aus verschiedenen Molkeereibetrieben Süddeutschlands, die Vorzugsmilch aus einem landwirtschaftlichen Betrieb; alle wurden in Lebensmittelgeschäften gekauft.

Vorher wurde in einem Modellversuch geprüft, wie hoch die Wiedergewinnungsrate von Enterotoxin (Typ B) mit dem Extraktionsverfahren nach ZEHNEN und ZEHNEN (1968) bzw. REISER et al. (1974) aus pasteurisierter Vollmilch ist. Im Anschluß daran wurden Modellversuche durchgeführt, in denen verschiedene Milchproben (pasteurisierte Vollmilch, Vorzugsmilch und ultrahocherhitzte Milch) mit 32.000 bis 92.000 Enterotoxin-B-bildenden Staphylokokken/ml beimpft und nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C auf das Vorhandensein von Enterotoxin B untersucht wurden. Die angegebene Temperatur wurde gewählt, um für Staphylokokkenwachstum und Enterotoxinbildung optimale Bedingungen zu schaffen. Weiterhin wurde geprüft, inwieweit Antibiotika und Joghurtkulturen die Enterotoxinbildung in Milch beeinflussen können.

3.2. Methodik

3.2.1. Nachweis von koagulasepositiven Staphylokokken

Für den Nachweis von koagulasepositiven Staphylokokken in Milch wurde das Anreicherungsmedium nach GIOLITTI und CANTONI (1966) und der Eigelb-Tellurit-Glykokoll-Pyruvat-Agar (ETGPA) nach BAIRD-PARKER (1962) verwendet. Da diese Verfahren bereits ausführlich in der Arbeit von KUHNT (1974) beschrieben wurden, soll hier lediglich auf die abweichende Beimpfung des ETGPA eingegangen werden.

Auf die Oberfläche des in Petrischalen befindlichen ETGPA wurden 1 und 0,1 ml der 1:100 verdünnten Milchproben (99 ml physiologische Kochsalzlösung plus 1 ml Milch) mit einer Demeterpipette aufgetragen und anschließend mit einem Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Die beimpften Petrischalen wurden 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

3.2.2. DNase-Test

Als Hinweis für die Anwesenheit koagulasepositiver Staphylokokken - auch abgetöteter und nicht mehr vermehrungsfähiger - wurde im Modellversuch 3.3.3.2. außerdem der DNase-Test in Anlehnung an die Beschreibung von TATINI (1975) durchgeführt:

100 ml der zu untersuchenden Probe werden mit n HCl auf pH 4,5 eingestellt und in einer Kühlzentrifuge bei 3°C und 15.000 U/min. 10 Minuten lang zentrifugiert. Dem Überstand werden 0,05 Volumeneinheiten 3M Trichloressigsäure zugesetzt und nochmals wie oben zentrifugiert. Das Sediment wird mit 2N NaOH auf pH 8,5 eingestellt und mit 0,05 M Tris-Puffer auf 2,0 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird 15 Minuten lang gekocht. Anschließend werden 5 µl in die 2 mm großen Vertiefungen der vorher hergestellten Toluidinblau-DNS-Agar-

Platten pipettiert und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Bebrütung wird die Größe der sich bildenden rosaroten Zonen gemessen, die sich linear zur logarithmischen Konzentration der DNase verhält. Zur Herstellung der Toluidinblau-DNS-Agar-Platten wurden 0,3 g Bacto-DNase-Test-Agar (Difco, 063202) und 10 g Bacto-Agar (Difco, 0140-01) in 1000 ml eines 0,05 m Tris-Puffers (pH 9,0), der 0,001 m CaCl_2 enthält, gelöst, 30 Minuten im Dampftopf erhitzt und nach Abkühlung auf 45°C mit 3 ml einer 0,1 m Toluidinblau-Lösung versetzt. Die Durchführung des Testes erfolgte mit dem Besteck der LKB-Immunophor-Ausrüstung analog zum modifizierten Ouchterlony-Test (siehe unter 3.2.3.2.2.).

3.2.3. Nachweis von Enterotoxinen

Um Lebensmittel auf das Vorhandensein von Enterotoxinen prüfen zu können, müssen diese erst von wasserlöslichen und wasserunlöslichen Bestandteilen getrennt und konzentriert werden. Bei den 55 handelsüblichen Milchproben und im Modellversuch zur Ermittlung der Wiedergewinnungsrate wurde das von ZEHREN und ZEHREN (1968) modifizierte Verfahren nach CASMAN und BENNETT (1965) angewendet. Ausführliche Angaben zur Durchführung dieser Methode sind in der Arbeit von KUHNT (1974) zu finden.

Die weiteren Modellversuche wurden in Anlehnung an das inzwischen veröffentlichte Verfahren von REISER et al. (1974) behandelt. Der Modellversuch zur Ermittlung der Wiedergewinnungsrate wurde zum Vergleich auch mit letztgenanntem Verfahren durchgeführt.

3.2.3.1. Extraktion in Anlehnung an das Verfahren von REISER et al. (1974)

100 ml der zu untersuchenden Milch werden in einen Erlenmeyerkolben (300 ml) mit n HCl auf pH 4,5 eingestellt. Anschließend wird bei 4°C 20 Minuten bei 12.000 U/min. zentrifugiert (Heraeus Christ, Zeta 2000). Der Überstand wird durch einen Faltenfilter filtriert und mit n NaOH

auf pH 7,5 eingestellt. Die Flüssigkeit wird nach Zusatz von etwa 10% Chloroform 3 - 5 Minuten mit einem Magnetrührer kräftig gemischt. Anschließend wird sie erneut bei 4°C 20 Minuten lang bei 12.000 U/min. zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird filtriert, auf pH 4,5 eingestellt und nochmals wie vorher zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird nach weiterer Filtration mit n NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Das Enterotoxin wird nun an den Ionenaustauscher Amberlite CG-50 (Serva), der vorher aufbereitet werden muß, adsorbiert.

Zur Aufbereitung des Ionenaustauschers werden 100 g Amberlite in 1,5 l Aqua dest. unter Rühren mit 5 n NaOH bei mehrmaliger Kontrolle auf pH 12 eingestellt und nach pH-Konstanz eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua dest. wird dann mit 5 n HCl auf pH 2 eingestellt und ebenfalls noch eine Stunde gerührt. Das Harz wird nun wiederum dreimal mit Aqua dest. gewaschen und mit 0,005 m Phosphatpuffer (pH 5,6) äquilibriert, bis der pH von 5,6 unverändert bleibt.

Zu 100 ml der auf pH 7,5 eingestellten zu untersuchenden Flüssigkeit werden ca. 20 g des äquilibrierten Ionenaustauscharztes gegeben, das Gemisch auf pH 5,6 eingestellt und eine Stunde unter ständiger pH-Kontrolle (5,6) bei 4°C mit mittlerer Geschwindigkeit gerührt. Nach Absetzen des Harzes wird der Überstand durch einen Buchner-Trichter abgossen und verworfen. Anschließend wird das Harz mit ca. 200 ml eines 0,015 m Natrium-Phosphatpuffers (pH 5,9) - 0,09% NaCl enthaltend - gewaschen (Magnetrührer), bis der Überstand vollkommen klar ist.

Zur Elution des gebundenen Toxins wird das Amberlite CG-50 mit ca. 30 ml einer 0,15 m Dinatriumhydrogenphosphatlösung, die 0,9% NaCl enthält, versetzt, auf pH 6,8 eingestellt und 45 Minuten lang bei 4°C auf einem Magnetrührer durchgemischt. Danach wird das Harz mit Hilfe eines Buchner-Trichters unter mehrmaligem Nachspülen getrennt

und das Filtrat wird zur Konzentrierung des nunmehr extrahierten und abgetrennten Enterotoxins in einen Dialysierschlauch (Visking, Union Carbide Corp.) verbracht, der vorher ca. fünf Minuten lang in Aqua dest. gekocht wurde. Die Einengung erfolgt in einer 50%igen Lösung von Polyäthylenglykol 20.000 (Serva) für ca. zwölf Stunden bei 4°C. Danach wird der Schlauch abgewaschen und zehn bis zwanzig Minuten in warmes Wasser gelegt, damit eventuell an der Innenseite des Schlauches haftende Toxine gelöst werden. Nach Entleerung des Dialysierschlauches wird noch dreimal mit Aqua dest. gespült, wobei die Gesamtmenge des gewonnenen Konzentrates 5 ml nicht überschreiten soll. Das Konzentrat wird nun nochmals mit 0,5 ml Chloroform vermischt und bei 20.000 U/min. 20 Minuten zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird vorsichtig abdekantiert bzw. filtriert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird bis zur Durchführung des Toxinnachweises in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

3.2.3.2. Serologischer Nachweis von Enterotoxin A, B, C, D und E

3.2.3.2.1. Objektträger-Gel-Diffusionstest nach WADSWORTH (1957)

Die 55 handelsüblichen Milchproben wurden nach dem in der Arbeit von KUHNT (1974) ausführlich beschriebenen Objektträger-Gel-Diffusionstest nach WADSWORTH (1957) untersucht.

3.2.3.2.2. Modifizierter Ouchterlony-Test (MO-Test) nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975)

Mit diesem Nachweisverfahren wurden sämtliche Proben der Modellversuche untersucht. Es beruht darauf, daß Antigen (AG) und Antikörper (AK) von ihrem jeweiligen Auftragungsort aus radiär in ein Gel diffundieren und innerhalb entsprechender Reaktionszeit AG-AK-Komplexe bilden, die als Präzipitationslinien sichtbar werden.

Zur Durchführung des Testes wurde das handelsübliche Besteck der LKB-Immunophor-Ausrüstung benutzt. Jeweils sechs mit Alkohol gereinigte Objektträger (76 x 26 mm) werden in einen Plastikrahmen eingelegt. Die Fugen zwischen Glasrändern und Rahmen werden mit ca. 2 ml heißer Agaroselösung (1%ig) ausgegossen, damit bei der anschließenden Beschichtung der Objektträger das flüssige Gel nicht ablaufen kann. Im Hauptguß werden jeweils drei Objektträger mit 10 ml Agarose, der 1% Polyäthylenglykol zugesetzt ist, überschichtet, nachdem der Rahmen auf einem plan ausgerichteten Nivelliertisch eingespannt worden ist. Nach Erstarren der Gelschicht (ca. 10 Minuten) können die Testplatten in einer feuchten Kammer bei ca. 7°C einige Tage aufbewahrt werden.

Für den Diffusionstest werden mit einer Lochstanze von 3 mm Durchmesser aus der Gelschicht Zylinder in diagonaler Anordnung ausgestanzt, die mittels einer Pasteurpipette über eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden. Die so entstandenen Probenlöcher besitzen ein Fassungsvermögen von 7 µl. Beim sogenannten Diagonalmuster stehen drei parallele Lochreihen mit je 5 bzw. 4 Löchern zur Verfügung, wobei in die obere Reihe (5 Löcher) die zu prüfende Probe (das Lyophilisat wird mit 0,2 ml Aqua dest. gelöst), die mittlere Lochreihe (4 Löcher) mit Antiserum (Serva) und die untere (5 Löcher) mit Referenztoxin (Serva) gefüllt wird (Abb. 1).

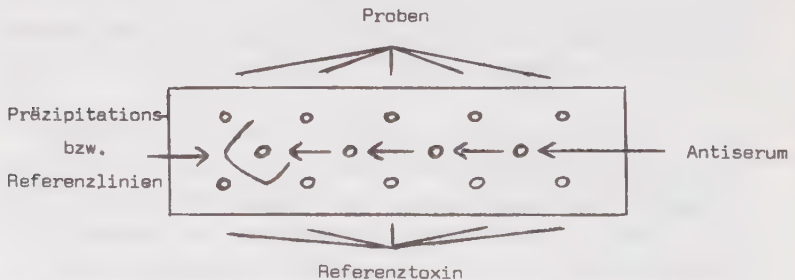


Abb. 1: Modifizierter Ouchterlony-Test (MO-Test) nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975)

Zur Entwicklung der Präzipitationslinien werden die Platten in einer feuchten Kammer 18 - 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wird die Agaroseschicht nach Abspülen der Objektträger mit Aqua dest. mit nassen Filterpapierstreifen bedeckt und bei 37 - 50°C an die Objektträgeroberflächen angetrocknet. Die Färbung erfolgt in einer Coomassie-Brillant-Blue-Lösung für 3 - 5 Minuten. Präzipitationslinien werden nach Entfärbung (5 Minuten) in einem auf 40 - 60°C erhitzten Methanol-Eisessig-Gemisch sichtbar. Wenn zwischen Probe und Antiserum eine Präzipitationslinie ausgebildet ist, die nahtlos in die Referenzlinie von Antiserum und Referenztoxin übergeht, ist in der Probe das homologe Toxin enthalten. Bilden sich keine Referenzlinien aus, so ist der Test nicht verwertbar und muß wiederholt werden.

Reagenzien und Lösungen zum modifizierten Ouchterlony-Test:

Agarose-Gel: 1 g Polyäthylenglykol 6000 (Merck)
1 g Agarose (Litex, Glostrup)
ad 100 ml Barbitalpuffer (pH 8,6)

Barbital-Puffer: 8,24 g Barbital-Natrium (Merck; 5,5-diäthylbarbitursäure Na-Salz)
1,6 g Barbital (Merck; 5,5 diäthylbarbitursäure)
ad 2000 ml Aqua dest. (pH 8,6)

Coomassie-Brillant-Blue-Lösung (1 l):
5 g Coomassie-Brillant-Blue R 250 rein (Serva)
450 ml Methanol (Merck)
100 ml Eisessig (Merck)
8 - 10 Stunden im Kühlschrank; anschließend Filtrieren
450 ml Aqua dest.

Entfärbelösung: 250 ml Methanol
100 ml Eisessig
450 ml Aqua dest.
Die Lösung kann durch Filtration mit Aktivkohle regeneriert werden.

3.2.3.2.3. Einfach-Gel-Diffusionstest nach OUDIN (1952)

Zur Ermittlung der Wiedergewinnungsrate von Enterotoxin B aus Milch wurden die Proben nach Extraktion und Konzentration mit dem Einfach-Gel-Diffusionstest nach OUDIN (1952) untersucht. Die genaue Durchführung des Testes ist in der Arbeit von KUHNT (1974) dargestellt.

3.3. Modellversuche

3.3.1. Wiedergewinnungsrate von Enterotoxin B aus pasteurisierter Milch

Beim Nachweis von Enterotoxinen in Lebensmitteln geht ein großer Teil der ursprünglich vorhandenen Menge durch das Extraktionsverfahren verloren. Es muß geklärt werden, wie hoch dieser Verlust bei Untersuchung von Milch ist und welche Toxinmenge noch nachgewiesen werden kann.

Zur Bestimmung der Wiedergewinnungsrate wurde handelsübliche pasteurisierte Vollmilch in fünf gleiche Portionen zu je 100 ml aufgeteilt und vier Proben Enterotoxin B (Serva, Heidelberg) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, die fünfte diente als Kontrolle (Tabelle 2).

Tabelle 2:

Probe	1	2	3	4	5 (Kontrolle)
Toxinzusatz (mcg)	100	50	25	20	-

Die Proben wurden auf dem Magnetrührer gut durchgerührt und den beiden bereits beschriebenen Extraktionsverfahren (3.2.3.) unterzogen. Die Ermittlung des Enterotoxin B-Gehaltes erfolgte mit dem Einfach-Gel-Diffusionstest (3.2.3.2.3.). Die Milch wurde vor Zugabe von Enterotoxin B auf Anwesenheit von koagulasepositiven Staphylokokken und Enterotoxin A, B, C, D und E getestet.

3.3.2. Vermehrung und Enterotoxinbildung von Enterotoxin B-bildenden Staphylokokkenstämmen in Milch bei 37°C

Zur Überprüfung der Keimvermehrung und des Enterotoxinbildungsvermögens in Milch wurden die Enterotoxin B-bildenden Stämme S 6 (ATCC 13566) und 243 (ATCC 14458) in verschiedenen Milcharten (pasteurisierte Vollmilch, Vorzugsmilch und ultrahocherhitzte Milch) bei der für Staphylokokkenwachstum und Enterotoxinbildung optimalen Temperatur von 37°C inokuliert. Ein Teil der pasteurisierten Vollmilchproben wurde zur Ausschaltung einer eventuellen Rekontaminationsflora vor Versuchsbeginn im Wasserbad 20 Minuten bei 65°C erhitzt.

Zunächst wurden die Stämme von einer Schrägagarkultur mit 5 ml steriler Herz-Hirn-Bouillon (CM 225, Oxoid) abgeschwemmt, in 250 ml der gleichen Nährlösung verimpft und bei 37°C inkubiert. Nach 3 - 6 Stunden wurde zur orientierenden Bestimmung der Keimzahl die Messung der optischen Dichte bei 650 nm (Beckman-Spectrophotometer DB-1) durchgeführt. Bei Anwesenheit von 4×10^{-7} bis 8×10^{-7} Staphylokokken/ml (Extinktion ca. 0,3) wurden je nach Staphylokokkendichte 0,05 bis 0,5 ml Bouillon in die einzelnen zu je 100 ml in sterile Erlenmeyerkolben abgefüllten Milchproben überimpft und diese 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Die inokulierte Staphylokokkenmenge betrug 32.000 bis 92.000/ml. Vor der Beimpfung wurde die Gesamtkeimzahl der Milchproben im Koch'schen Plattenverfahren mit Plate-Count-Agar bestimmt.

Zur Bestimmung der Staphylokokkenzahl bzw. zur Ermittlung der Wachstumsrate wurde der Nährboden nach BAIRD-PARKER (1962) (3.2.1.) und abweichend von den vorherigen Versuchen Plate-Count-Agar mit Zusatz von 7,5% NaCl (in Anlehnung an den Mannit-Salz-Agar nach CHAPMAN, 1945) verwendet. Die Toxinbildung wurde mit dem unter 3.2.3.1. beschriebenen Extraktionsverfahren nach REISER et al. (1974) und mit dem modifizierten Ouchterlony-Test überprüft.

3.3.3. Einfluß von Penicillin und Joghurtkulturen auf Staphylokokkenwachstum und Enterotoxinbildungsvermögen in Milch bei 25°C

3.3.3.1. Einfluß von Penicillin

Um zu ermitteln, inwieweit penicillinresistente Enterotoxin B-bildende Staphylokokken in penicillinhaltiger Milch beeinflußt werden, wurde das Wachstum und die Toxinbildung des Staphylokokkenstammes 243 (ATCC 14458) in Milchproben (pasteurisierte Vollmilch, Vorzugsmilch und ultrahocherhitzte Milch) mit verschiedenen Penicillinkonzentrationen untersucht.

Zur Aktivierung wurde der Stamm 243, der an Porzellanperlen getrocknet aufbewahrt wird, in 100 ml steriler Hirn-Herz-Bouillon (CM 225, Oxoid) 15 Stunden bei 37°C bebrütet. Im Resistenztest (Lochtest) war der Stamm gegenüber Penicillin bis zu einer Konzentration von 5 IE unempfindlich.

Anfänglich wurden die pasteurisierten Vollmilchproben vor Versuchsbeginn 20 Minuten auf 65°C erhitzt. Da bei dieser Erhitzung immer noch so viele Keime überlebten, daß es zur Wachstumsunterdrückung der Staphylokokken kam, wurden anschließend die Proben im Dampftopf für 15 Minuten auf 100°C erhitzt. Alle Proben (verschiedene Milcharten) wurden zu je 100 ml abgefüllt und mit Penicillin G-Na in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 2,0; 5,0; 10,0 IE/ml) versetzt. Anschließend wurden die Proben mit je 0,1 ml der staphylokokkenhaltigen Bouillon beimpft (ca. 56.000 Staphylokokken/ml Milch) und 48 Stunden bei 25°C bebrütet. Als Kontrolle wurde eine penicillinfreie Milch angesetzt. Die Bestimmung der Staphylokokkenzahl sowie der Toxinnachweis erfolgten nach den unter 3.3.2. beschriebenen Methoden.

3.3.3.2. Einfluß von Penicillin und Joghurtkulturen

Zur Aktivierung der Staphylokokken wurde der an Prozellanperlen getrocknete Stamm 243 in 10 ml Hirn-Herz-Bouillon 10 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden zur Adaptierung in Milch 0,1 ml dieser Keimsuspension in 10 ml Vollmilch inokuliert und 20 Stunden bei 30°C bebrütet. Im Durchschnitt waren nach der Bebrütung 213.000 Staphylokokken/ml Inokulum enthalten.

Zur Kultivierung der Joghurtkulturen^{*)} wurden 2 ml eines handelsüblichen Joghurts in 100 ml erhitzter Milch inokuliert und für 90 Minuten in ein Wasserbad mit 42°C verbracht. Nach Abkühlung (1 Stunde bei Zimmertemperatur) wurde die Kultur 12 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.

Von sieben zu je 300 ml abgefüllten und wie oben erhitzten pasteurisierten Vollmilchproben wurden vier Proben mit 10, 5, 0,5 und 0,1 IE Penicillin G-Na versetzt. Anschließend wurden sämtliche Proben mit 0,1 ml der Staphylokokkenkultur und 0,1 ml der Joghurtkultur beimpft und 48 Stunden bei 25°C bebrütet. Als Kontrolle dienten die drei Proben ohne Penicillinzusatz.

Zur Bestimmung des Staphylokokkenwachstums nach der Bebrütung wurde außer dem Nährboden nach BAIRD-PARKER (1962) auch der DNase-Test herangezogen.

Die Bestimmung der Staphylokokkenzahl sowie der Enterotoxinnachweis wurde wie unter 3.3.2. durchgeführt.

^{*)} Anfängliche Versuche mit Butter-Säurewecker erbrachten keinen zufriedenstellenden Versuchsablauf.

3.4. Ergebnisse

3.4.1. Vorkommen von koagulasepositiven Staphylokokken und Enterotoxinen in handelsüblicher Milch

Bei der Untersuchung der 55 verschiedenen handelsüblichen Milchproben (pasteurisierte Vollmilch, pasteurisierte teilentrahmte Milch, Vorzugsmilch und ultrahocherhitzte Milch) (Tabelle 1) konnten keine koagulasepositiven Staphylokokken und kein Enterotoxin (A, B, C, D und E) nachgewiesen werden.

3.4.2. Wiedergewinnungsrate von Enterotoxin B aus pasteurisierter Vollmilch

Die Ergebnisse der Wiedergewinnungsrate sind in Tabelle 3 zusammengefaßt:

Tabelle 3: Wiedergewinnungsrate von Enterotoxin B aus pasteurisierter Vollmilch

Probe	zugesetzt	Enterotoxin mcg/100 ml nachgewiesen	
		Verfahren n. ZEHREN und ZEHREN	Verfahren n. REISER et al.
1	100	46 (46%)	62 (62%)
2	50	16 (32%)	24 (48%)
3	25	4 (16%)	6 (24%)
4	20	0	2 (10%)
5	0	0	0

Wie zu ersehen ist, konnte mit dem Extraktionsverfahren nach ZEHREN und ZEHREN in drei der fünf Proben (25 - 100 mcg) Enterotoxin B nachgewiesen werden, wobei mit zunehmender Toxinkonzentration 16 - 46% wiedergewonnen werden konnten. Mit dem Verfahren nach REISER et al.

(1974) gelang der Toxinnachweis in vier Fällen bei einer Wieder-
gewinnungsrate von 10 bis 62%. In der Kontrollprobe konnten in
beiden Fällen weder koagulasepositive Staphylokokken noch Entero-
toxin A, B, C, D oder E nachgewiesen werden.

Zusätzliche Versuche zum Nachweis von weniger als 20 mcg Entero-
toxin B/100 ml Milch blieben erfolglos.

3.4.3. Vermehrung und Enterotoxinbildung von Staphylokokken in Milch bei 37°C

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die gefundenen
Staphylokokkenzahlen entsprechen dem Mittelwert der auf beiden
Nährböden (BAIRD-PARKER-Nährboden, Plate-Count-Agar mit 7,5% NaCl)
erzielten Keimzahlen.

Wie Tabelle 4 zeigt, konnten sich die inokulierten Staphylokokken
in pasteurisierter Trinkmilch mit im Vergleich zu der folgenden
Versuchsreihe relativ hoher Gesamtkeimzahl 83.000 bis 127.000)
schwächer (maximal 32×10^6 /ml) vermehren. In keiner Probe war
Enterotoxin B nachweisbar. Wurden die Proben vor Versuchsbeginn
im Wasserbad 20 Minuten bei 65°C erhitzt (GKZ weniger als
16.000/ml), so zeigte sich vermehrtes Staphylokokkenwachstum
(über 56×10^6 /ml). Bei zwei dieser erhitzten Proben mit Keim-
zahlen von 136×10^6 und 184×10^6 Staphylokokken/ml verlief der
Enterotoxinnachweis positiv.

In Vorzugsmilchproben mit weniger als 3.400 Keimzahlen/ml waren
nach 24 Stunden bei gleichen Inokula 13×10^6 bis 196×10^6
Staphylokokken/ml zu verzeichnen. Der Toxinnachweis gelang sicher
in zwei Proben, die nach der Bebrütung 172 bzw. 196×10^6 Staphy-
lokokken/ml enthielten und mit Einschränkung bei der Probe mit
 62×10^6 /ml. Das beste Staphylokokkenwachstum wurde in ultrahoch-
erhitzter Milch (weniger als 20 Keime/ml) erzielt. Bei Staphylo-
kokkenzahlen von mehr als 220×10^6 wurde in sechs von zehn
Proben Enterotoxin nachgewiesen.

Tabelle 4: Staphylokokkenwachstum und Enterotoxinbildung in Milch
bei 37°C

Milchart	Gesamt- keimz.	beimpft mit Staph./ml	Staph.-Zahl (10^6 /ml) nach 24 Std.	Enterotoxin
past. Vollm.	94.000	52.000	16	-
"		64.000	13	-
"		38.000	8	-
"	127.000	74.000	9	-
"		49.000*)	21	-
"	83.000	84.000	11	-
"		32.000	6	-
"		56.000	32	-
"	90.000	42.000*)	18	-
"		92.000	22	-
Vorzugsmilch	3.400	52.000	46	-
"		64.000	62	(+)
"		38.000	172	+
"	2.500	74.000	112	-
"	1.900	49.000*)	77	-
"		84.000	196	+
"		32.000	22	-
"		56.000	44	-
"		42.000*)	13	-
"		92.000	27	-
H-Milch	6	52.000	430	+
"	18	64.000	390	+
"		38.000	380	-
"	8	74.000	340	+
"		49.000*)	560	+
"		84.000	620	-
"		32.000	220	-
"		56.000	510	+
"		42.000*)	480	+
"		92.000	230	-
past. Vollm. (nochmals er- hitzt)	16.000	47.000	68	-
"	8.000	55.000	56	-
"	2.800	64.000	72	-
"	1.700	58.000	136	+
"		71.000	184	+

Bei den mit *) gekennzeichneten Proben wurde Stamm 243 verwendet, bei sämtlichen anderen Proben Stamm S 6.

3.4.4. Einfluß von Penicillin auf Staphylokokkenwachstum und Enterotoxin* in Milch bei 25°C

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Einfluß von Penicillin auf Staphylokokkenwachstum und Enterotoxinbildung in Milch bei 25°C

Milchart	Penicillin IE/ml	Staph. n. 24 Std. (10^6 /ml)	n. 48 Std. (10^6 /ml)	Toxin
past. Vollm.	-	86		-
(nochmals	0,1	120		-
erhitzt)	0,5	340		+
"	2	440		-
"	5	520	130	+
"	10	30	28	-
Vorzugsmilch	-	56		-
"	0,1	61		-
"	0,5	83		-
"	2	71		-
"	5	68	61	-
"	10	54	43	-
H-Milch	-	370		+
"	0,5	230		+
"	5	60		-

Die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen, daß sich Staphylokokken in pasteurisierter Vollmilch mit 0,1 bis 0,5 IE Penicillin stärker vermehren konnten ($120 - 520 \times 10^6$ /ml) als in der penicillinfreien Probe (86×10^6 /ml). In Vorzugsmilch waren, verglichen mit pasteurisierter und ultrahocherhitzter Milch relativ wenig Staphylokokken gewachsen (max. 83×10^6 /ml). Es zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen

penicillinfreier und penicillinhaltiger Vorzugsmilch. Im Gegensatz dazu war in hocherhitzter Milch mit 0,5 und 5 IE Penicillin vermindertes Staphylokokkenwachstum ($60 - 230 \times 10^6/\text{ml}$) feststellbar, während sich diese Keime im penicillinfreien Ansatz gut vermehrten ($370 \times 10^6/\text{ml}$).

Enterotoxin B konnte in pasteurisierten Vollmilchproben lediglich bei Zusatz von 0,5 bzw. 5 IE nachgewiesen werden. In beiden Proben waren nach 24 Stunden 340 bzw. 520×10^6 Staphylokokken/ml enthalten. Bei Zusatz von 2 IE (440×10^6 Staphylokokken/ml) konnte allerdings kein Toxin gefunden werden. Der Nachweis von Enterotoxin in Vorzugsmilch verlief in allen Fällen negativ. In ultrahocherhitzter Milch war sowohl die penicillinfreie als auch die Probe mit 0,5 IE Penicillin enterotoxinhaltig. Bei Zusatz von 5 IE war kein Toxin nachweisbar ($6 \times 10^7/\text{ml}$).

3.4.5. Einfluß von Penicillin und Joghurtkulturen auf Staphylokokkenwachstum und Enterotoxinbildung in Milch bei 25°C *)

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

*) Vorausgegangene Versuche mit Säureweckern erbrachten keine verwertbaren Ergebnisse.

Tabelle 6: Einfluß von Penicillin und Joghurtkulturen auf Staphylokokkenvermehrung und Enterotoxinbildung

Proben	Penicillin- zusatz (IE/ml)	Staph.-Zahl nach 24 Std. $10^6/\text{ml}$	Staph.-Zahl nach 48 Std. $10^6/\text{ml}$	Toxin	DNase
Säurewecker + Staphylokokken	0,1	230	30	-	+
"	0,5	340		-	+
"	5	520		+	+
"	10	310	190	-	+
"	-	80		-	+
Säurewecker	-	0		-	-
Staphylokokken	-	430	320	+	+

Aus den Ergebnissen ist zu ersehen, daß die Staphylokokken in den nochmals erhitzten pasteurisierten Vollmilchproben mit Zusatz von Joghurtkulturen und zunehmender (0,1; 0,5 und 5 IE) Penicillinkonzentration steigende Wachstumsraten zeigten (23×10^7 , 34×10^7 bzw. $52 \times 10^7/\text{ml}$). In der Probe mit Joghurtkulturen, aber ohne Penicillin, war dagegen deutlich eine geringere Staphylokokkenvermehrung zu verzeichnen; ebenso wurde bei Zusatz von 10 IE eine verminderte Vermehrungsrate im Vergleich zu 5 IE festgestellt (31×10^7 bzw. 52×10^7). In der penicillinfreien Milch bei Anwesenheit von Joghurtkulturen konnten keine Staphylokokken nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte anhand des DNase-Testes ebenfalls bestätigt werden. In der Probe ohne Penicillin und ohne Joghurtkulturen konnten sich die Staphylokokken gut vermehren ($43 \times 10^7/\text{ml}$). Enterotoxin B konnte in der 5 IE Penicillin und in der nur Staphylokokken enthaltenden Probe nachgewiesen werden.

4. Besprechung der Ergebnisse.

Nachdem koagulasepositive, darunter z.T. enterotoxinbildende, Staphylokokken in Anlieferungsmilch angetroffen werden können, ist die Frage nach dem Risiko für den Konsumenten von Trinkmilch berechtigt. Über Vergiftungen durch rohe Trinkmilch wurde hauptsächlich in früheren Jahren berichtet (BARBER, 1914; RAMSEY und TRACY, 1930; CRABTREE und LITTERER, 1934; u.a.). Dabei fällt allerdings auf, daß diese Intoxikationen überwiegend durch den Genuß von Rohmilch, die von mastitiskranken Tieren, insbesondere von Ziegen, stammte, hervorgerufen wurden und daß die Milch in vielen Fällen mehrere Stunden ungekühlt aufbewahrt worden war. Vermutlich waren in diesen Fällen die Keime bereits an Milch adaptiert. Unter den gegenwärtigen technologischen und hygienischen Verhältnissen wird in den entwickelten Ländern die Gefahr von Staphylokokkenenterotoxikosen durch pasteurisierte Trinkmilch für gering erachtet, dennoch bleibt ein Restrisiko. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher, handelsübliche Milchproben auf das Vorkommen von koagulasepositiven Staphylokokken sowie Enterotoxinen zu prüfen. Weiterhin sollte festgestellt werden, inwieweit Gesamtkeimzahl, Lagerungstemperatur, Penicillin und Joghurtkulturen das Staphylokokkenwachstum und die Enterotoxinbildung in mit Staphylokokken kontaminierter Milch beeinflussen können. Diese Modelle zielten einerseits auf das gelegentliche Vorkommen von Antibiotikarückständen in Milch, andererseits auf Gewohnheiten von Verbrauchern, Milch u.U. mit Joghurtkulturen zum Sauerwerden aufzustellen. Um die methodischen Voraussetzungen abzuklären, mußte festgestellt werden, wie hoch bei den angewandten Extraktionsverfahren die Wiedergewinnungsrate von Enterotoxin B ist.

55 handelsübliche Milchproben (pasteurisierte Vollmilch, pasteurisierte teilentrahmte Milch, Vorzugsmilch und ultrahocherhitzte Milch) wurden mit dem Anreicherungsmedium nach GIOLITTI und CANTONI (1966)

sowie dem EGTPA nach BAIRD-PARKER (1962) auf das Vorhandensein von koagulasepositiven Staphylokokken untersucht. Der Nachweis von Enterotoxin A, B, C, D und E erfolgte mit dem Extraktionsverfahren nach ZEHREN und ZEHREN (1968) und mit dem Objektträger-Gel-Diffusionstest nach WADSWORTH (1957). Die Untersuchungen verliefen bei allen Proben sowohl hinsichtlich der Keime als auch der Toxine negativ.

In der Literatur wurde vor allem in früheren Jahren des öfteren über das Vorkommen von koagulasepositiven Staphylokokken in Rohmilch (CLARK et al., 1961; WORSECK, 1960; CASMAN, 1965; TERPLAN et al., 1971; SCHMIDT et al., 1972; u.a.) und in erhitzter Milch (CHALLINOR et al., 1943) berichtet. In erhitzter Milch ist aufgrund der heutigen Pasteurisierungsverfahren (WALKER und HARMON, 1963; ZOTTOLA et al., 1969; SHEIKH und LUEDECKE, 1974; u.a.) kaum mit koagulasepositiven Staphylokokken zu rechnen, es sei denn, daß sie nach der Erhitzung rekontaminiert wurde. TOLLE et al. (1971) konnten in 1920 pasteurisierten Milchproben lediglich einmal Staphylokokken nachweisen. Der negative Staphylokokkenbefund bei den zehn Vorzugsmilchproben ist aufgrund der geringen Probenzahl nur beschränkt aussagefähig, zumal sämtliche Proben nur von einem Vorzugsmilchbetrieb stammten und die Versuche innerhalb von acht Wochen durchgeführt wurden. Degen waren nach SEELEMAN et al. (1963) 38,2% von 514 Proben aus 34 Vorzugsmilchbetrieben (bei einer Versuchsdauer von 14 Monaten) frei von Staphylokokken. In drei dieser Betriebe (34 Proben) konnten während der Versuchsdauer entweder gar keine (> 50%) oder bis höchstens 500/ml nachgewiesen werden. SCHMIDT et al. (1972) konnten lediglich aus 7,7% von 514 Vorzugsmilchgemelken Staphylokokken isolieren, RITTMAYER (1964) in 21 von 40 Vorzugsmilchproben aus fünf Betrieben. Des weiteren ist zu beachten, daß die Vermehrung der aus Milch stammenden Staphylokokken eingeschränkt ist (CROSSLEY und CAMPLING, 1957). Das Wachstum wird außerdem durch Lagerungstemperaturen unter 15°C

weitgehend gehemmt (HEINEMANN, 1957; JONES et al., 1957; WALKER und HARMON, 1965; ABU-ELNAGA und KANDLER, 1965; u.a.).

Für die Bildung nachweisbarer Mengen von Staphylokokkenenterotoxin ist die erhebliche Vermehrung von Staphylokokken aufgrund eines Zusammentreffens meist mehrerer begünstigender Faktoren notwendig (MURRAY, 1960; ZEHREN und ZEHREN, 1968; BAUMGARTNER et al., 1968; TERPLAN und ZAADHOF, 1969; u.a.). Dabei spielen vor allem Lagerungstemperatur und Zeit sowie Gesamtkeimgehalt eine wichtige Rolle (DONNELLY et al., 1968; TATINI et al., 1971; u.a.). Da diese Faktoren aber bei ordnungsgemäß gelagerter roher und erhitzter Milch nur selten zusammentreffen, ist mit einer Bildung von Enterotoxinen in nachweisbaren Mengen kaum zu rechnen, abgesehen von Ausnahmefällen, wie sie z.B. von KOBAYASHI et al. (1955) beschrieben wurden. Dies könnte bei erhitzter Milch dann der Fall sein, wenn pasteurisierte Milch nach der Erhitzung durch menschliche Ausscheider kontaminiert wird (TERPLAN, 1969). Sind in der Anlieferungsmilch bereits Enterotoxine vorhanden, so erfolgt in der Molkerei durch Vermischung mit einwandfreier Milch eine derartige Verdünnung, daß eine Gefährdung des Menschen im allgemeinen nicht zu erwarten ist (UNTERMANN, 1973). Die Möglichkeit der Toxinbildung in Rohmilch (vor allem Vorzugsmilch) ist bei Einhalten der Auflagen für Erzeuger und Verbraucher ebenfalls für gering zu erachten (Hygiene-Verordnung für Milchabhof-Abgabe vom 24.5.1973, 1. AVO zum Milchgesetz vom 15. Mai 1931 und Vorzugsmilch-Verordnungen der Länder).

Zur Bestimmung des Enterotoxingehaltes in Milch wurde anfänglich das von CASMAN und BENNETT (1965) entwickelte und von ZEHREN und ZEHREN (1968) modifizierte Extraktionsverfahren, bei den nachfolgenden Versuchen auch die inzwischen veröffentlichte Methode nach REISER et al. (1974) angewendet. Letztere unterscheidet sich von jener nach ZEHREN und ZEHREN (1968) durch die Reinigung im "Batch"-Verfahren, wodurch ein erheblicher Zeit- und Arbeitsaufwand eingespart wird. REISER

et al. (1974) konnten mit dieser Methode bis zu 0,125 mcg Enterotoxin A/100 g Lebensmittel nachweisen, ZEHREN und ZEHREN (1968) mit ihrer Methode 0,003 mcg/g Käse. Zur Ermittlung der Toxinverluste bei den eigenen Untersuchungen wurden pasteurisierte Vollmilchproben mit definierten Mengen an Enterotoxin B (20 - 100 mcg/100 ml) versetzt und den beiden Extraktionsverfahren unterzogen. Der quantitative Toxinnachweis wurde mit dem Einfach-Gel-Diffusionstest nach OUDIN (1952) geführt. Es zeigte sich, daß - wie bei KUHN (1974) - die Wiedergewinnungsrate bei beiden Verfahren von der ursprünglichen Enterotoxinkonzentration abhängig war. So konnten mit der Extraktion nach ZEHREN und ZEHREN (1968) bei Toxinkonzentrationen von 20 mcg/100 ml Milch kein Toxin (0%), von 25 mcg/100 ml Milch ca. 4 mcg (16%), von 50 mcg/100 ml Milch ca. 16 mcg (32%) und von 100 mcg/100 ml Milch ca. 46 mcg (46%) wiedergefunden werden. Bei der Methode nach REISER et al. (1974) lagen die entsprechenden Werte bei ca. 2 mcg (10%), ca. 6 mcg (24%), ca. 24 mcg (48%) und ca. 62 mcg (62%). Aus den Werten ist ersichtlich, daß mit dem Verfahren von REISER et al. (1974) bessere Wiedergewinnungsraten erzielt werden konnten als mit dem von ZEHREN und ZEHREN (1968). Dies ist vermutlich auf die Verwendung unterschiedlicher Ionenaustauscher sowie auf die geringere Anzahl der Arbeitsgänge zurückzuführen.

Die von anderen Autoren genannten Wiedergewinnungsraten für das Verfahren nach ZEHREN und ZEHREN (1968) liegen z.T. höher, z.T. niedriger. So berichten CASMAN und BENNETT (1965), daß sie mit dem von ihnen entwickelten Verfahren in Abhängigkeit vom Lebensmittel 30 bis 69% des zugesetzten Enterotoxins A bzw. 48 bis 72% des zugesetzten Enterotoxins B im Objektträger-Gel-Diffusionstest nachweisen konnten. ZEHREN und ZEHREN (1968) fanden in ihrem modifizierten Verfahren 16 bis 35% des den Käseproben zugesetzten Enterotoxins A im untersuchten Extrakt wieder. GILBERT et al. (1972) erzielten in Garnelen- und Hühnerfleisch bei Enterotoxin A eine Wiedergewinnungsrate von nur 20% und ebenso MEYER (1973) mit dem Verfahren nach CASMAN (1967) bei

Enterotoxin B in Trockenmilchpulver. KUHNT (1974) konnte mit der Methode nach ZEHREN und ZEHREN (1968) in Joghurt 33 bis 50% des zugesetzten Enterotoxins B wiederfinden. REISER et al. (1974) verzichteten bei ihrem Verfahren auf prozentuale Wiedergewinnungsraten, da nach ihrer Ansicht die Methoden, die zum Nachweis von Enterotoxin herangezogen werden, keinen quantitativen Nachweis, sondern nur grobe Schätzungen ermöglichen.

Unter welchen Bedingungen es bei optimaler Wachstumstemperatur zur Enterotoxin B-Bildung in Milch kommen kann, wurde in Modellversuchen geprüft. Bei der Beurteilung dieser Frage ist zu berücksichtigen, daß enterotoxinogene Staphylokokken in entsprechenden Konzentrationen vorhanden sein müssen (WILSON et al., 1959; CLARK und NELSON, 1961; ABO-ELNAGA und KANDLER, 1965; DONNELLY et al., 1968; TATINI et al., 1971). Die Toxinproduktion ist abhängig vom Keimgehalt der Milch in qualitativer und quantitativer Hinsicht (TERPLAN und ZAADHOF, 1969) sowie von der Lagerungstemperatur (BOZOVIC, 1963; STOLMAKOVA, 1964; WALKER und HARMON, 1965; ABO-ELNAGA, 1965; DONNELLY et al., 1968; TATINI et al., 1971; TERPLAN et al., 1971; GHOSH, 1973).

Bei einer 24stündigen Bebrütung bei 37°C und bei einer Beimpfung der Milchproben mit ca. 32×10^3 Staphylokokken/ml Milch konnte in pasteurisierter Vollmilch mit Gesamtkeimzahlen von ca. $83 \text{ bis } 127 \times 10^3/\text{ml}$ kein Enterotoxin B nachgewiesen werden, was in erster Linie auf die hemmende Begleitflora zurückzuführen sein dürfte. Nach der Inkubation waren $6 \text{ bis } 32 \times 10^6$ Staphylokokken/ml enthalten. Dies zeigten auch Versuche von GHOSH (1973) mit pasteurisierten Milchproben, die $1,5 \text{ bis } 3 \times 10^6$ Keime/ml enthielten und mit weniger als 10^5 Staphylokokken/ml beimpft wurden. Erst nach Inokulation mit über 5×10^6 Staphylokokken/ml verlief der Nachweis positiv.

Wurde bei den eigenen Versuchen die pasteurisierte Milch zur Reduzierung der Begleitflora nochmals im Wasserbad 20 Minuten auf 65°C erhitzt, konnte bei Gesamtkeimzahlen von ca. 1.700 bzw. 2.800/ml und bei einem Inokulum von 71.000 bzw. 58.000 Staphylokokken/ml Milch nach 24 Stunden in zwei von fünf Proben Enterotoxin B nachgewiesen werden. Die positiven Proben enthielten nach der Bebrütung 184×10^6 bzw. 136×10^6 Staphylokokken/ml. DONNELLY et al. (1968) ermittelten, daß in pasteurisierten Milchproben mit ca. 10^3 Keimen/ml, denen 10^4 Staphylokokken/ml inokuliert worden waren, Enterotoxin A nach 12 Stunden bei 35°C nachweisbar war. Bei ihnen enthielten die Milchproben im allgemeinen 50 bis 100×10^6 Staphylokokken, wenn Enterotoxin A erstmals gefunden wurde. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch TATINI et al. (1971). Ihnen gelang der Nachweis von Toxin A allerdings schon ab 3×10^6 Staphylokokken/ml Milch.

In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß Enterotoxin A als primäres Stoffwechselprodukt angesehen wird (MARKUS und SILVERMAN, 1970), das hauptsächlich während der logarithmischen Wachstumsphase (3,5 Stunden) gebildet wird. Enterotoxin B wird als sekundäres Stoffwechselprodukt angesehen (MCLEAN et al. 1968; u.a.), das vor allem gegen Ende der logarithmischen bzw. zu Beginn der stationären Phase (16 Stunden) gebildet wird. Aus diesem Grunde wurden die Milchproben 24 Stunden lang bebrütet.

Die Abhängigkeit der Toxinbildung von Gesamtkeimzahl und Staphylokokkenwachstum zeigte sich auch bei eigenen Versuchen mit Vorzugsmilch. In zwei von den zehn keimarmen Rohmilchproben (ca. 1.900 bis 3.400 Keime/ml) war bei Staphylokokkenzahlen von 172 bzw. 196×10^6 /ml der Enterotoxinnachweis positiv, in einer Probe mit 112×10^6 Staphylokokken/ml fraglich. In keimarmer Rohmilch wird von DONNELLY et al. (1968) und von TATINI et al. (1971) die Toxinbildung bestätigt.

In ultrahocherhitzter Milch mit Gesamtkeimzahlen von 8 bis 18/ml konnte bei 37°C und 24stündiger Bebrütung am häufigsten Enterotoxin B festgestellt werden. Zu entsprechenden Ergebnissen mit Toxin A kamen TATINI et al. (1971) in Versuchen mit annähernd vergleichbaren Milchproben (keimfreie Sterilmilch, dampferhitzte Milch mit weniger als 30 Keimen/ml). In einigen Proben mit hohen Staphylokokkenzahlen (38×10^7 bzw. 26×10^7 /ml) konnte jedoch kein Toxin nachgewiesen werden. Diese unterschiedliche Toxinbildung ist eventuell auf Hemmstoffe (Peptide) zurückzuführen, die durch die Erhitzung entstehen.

In den eigenen Modellversuchen konnte – abgesehen von ultrahocherhitzter Milch – der Nachweis von Enterotoxin B im allgemeinen erst bei Staphylokokkenzahlen von mehr als 150×10^6 /ml Milch sicher geführt werden. Vermutlich ist Milch für Enterotoxin B-bildende Staphylokokken kein so gutes Nährmedium wie für A-Bildner. Nach einer Theorie von BERGDOLL (1972) wird die Toxin B-Bildung durch die sonst bei Lebensmittelvergiftungen im Lebensmittel vorhandenen Bedingungen gehemmt. In Versuchen mit verschiedenen Lebensmitteln wurde beobachtet, daß in jenen hauptsächlich Toxin A gebildet wird, ausgenommen in Fischprodukten (BERGDOLL, 1972). Nach BERGDOLL (1972) ist es auch möglich, daß ein Staphylokokkenstamm während des Wachstums in Lebensmitteln die Fähigkeit verliert, Enterotoxin B bilden zu können. So konnte z.B. festgestellt werden, daß ein Stamm, welcher Toxin A und B produziert, in Pudding nur Enterotoxin A bildete.

Die erhitzte Milch bietet für Staphylokokken gute Wachstumsbedingungen, wenn sie z.B. aufgrund einer Rekontamination durch Personen oder unsaubere Gerätschaften in die Milch hineingelangt sind und diese eine gewisse Zeit bei höheren Temperaturen gelagert wird (DONNELLY et al., 1968). Die Vermehrung der Staphylokokken wird insbesondere dann begünstigt, wenn die übrige, normalerweise bereits geringe Milchflora durch Antibiotika (JONES et al., 1957;

GRAVES und FRAZIER, 1963) oder durch Bakteriophagen (KLUPSCH, 1968) gehemmt wird. Eine Reihe dieser Begleitkeime ist empfindlich gegenüber Penicillin (0,01 bis 5 IE/ml) (KANDLER und FRANK, 1962; OBIGER, 1963 und SCHULZE, 1974), während nach Angaben von RUTHERFORD und CROWSON (1945), MASON (1945), PETER (1968), MAYER (1975) u.a. Staphylokokken eine mehr oder weniger starke Resistenz gegenüber Penicillin (bis zu 12,5 IE/ml) zeigen können. In Modellversuchen wurde getestet, ob es bei einer Temperatur, wie sie in Ausnahmefällen vorherrschen kann, in penicillinfreier sowie in penicillinhaltiger Milch zu einer Enterotoxinbildung kommt, nachdem diese mit enterotoxinogenen Staphylokokken rekontaminiert worden war. Um der ursprünglichen Keimzahl von pasteurisierter Vollmilch nach der Erhitzung gerecht zu werden, wurden die staphylokokken- und toxinfreien Proben vor Versuchsbeginn im Dampftopf auf 100°C erwärmt. Nach Zusatz von Penicillin wurden die Proben mit Staphylokokken beimpft und 48 Stunden bei 25°C bebrütet. Der Einfluß von Penicillin wurde auch bei der gleichen Temperatur und Bebrütungsdauer bei Vorzugsmilch und ultrahocherhitzter Milch untersucht.

Es zeigte sich dabei, daß sich Staphylokokken in den bis zu 5 IE Penicillin enthaltenden pasteurisierten Milchproben stärker vermehren konnten als in der Probe ohne bzw. mit 10 IE Penicillin, während bei Vorzugsmilch kein Unterschied und bei ultrahocherhitzter Milch ab 0,5 IE Penicillin sogar eine Wachstumsverminderung registriert wurde.

Das unterschiedliche Wachstum der Staphylokokken in pasteurisierter Milch ist durch die verschiedenen Penicillinzusätze und die damit verbundene Hemmung der Begleitflora bedingt. Die Beeinträchtigung der Staphylokokken durch 10 IE Penicillin/ml, die im Gegensatz steht zu den Angaben von RUTHERFORD und CROWSON (1945), MASON (1945), ist durch die unterschiedliche Resistenz der verschiedenen Staphylokokkenstämme (FRIEDMAN, 1968) und deren Herkunft (PULVERER, 1965 und 1966;

MEYER, 1966 a und b; PULVERER und ENTEL, 1967; GEDEK, 1968 und 1972; GRÜN, 1968] zu erklären.

In der Vorzugsmilch scheinen zu viele Penicillin-resistente bzw. zu wenig -sensible Begleitkeime vorhanden gewesen zu sein, so daß das Staphylokokkenwachstum nicht in toxinbildendem Umfang erfolgen konnte. Der negative Einfluß des Penicillins in ultrahocherhitzter Milch könnte dadurch zu erklären sein, daß durch den Mangel an Begleitkeimen sowie durch eine Veränderung der Milchkonsistenz infolge der Erhitzung die Wirkung des Penicillins auf das Staphylokokkenwachstum potenziert wurde. Eventuell spielen auch Hemmstoffe, die durch die Erhitzung freigesetzt wurden, eine Rolle.

Der Einfluß des Penicillins in den drei Milcharten wurde anhand der Enterotoxin-Bildung bestätigt. So konnte in der Vorzugsmilch kein Toxin, in der ultrahocherhitzten Milch in der penicillinfreien Probe und bei Zusatz von 0,5 IE Penicillin/ml Enterotoxin nachgewiesen werden. In der pasteurisierten Milch verlief der Nachweis von Enterotoxin B in den Proben mit 0,5 und 5 IE Penicillin/ml positiv. Fraglich bleibt, weshalb in der Probe mit 2 IE Penicillin/ml auch bei Wiederholung des Nachweises kein Toxin gefunden werden konnte.

In abschließenden Versuchen konnte bestätigt werden, daß Milchsäurebildner (Joghurtkulturen) das Wachstum und die Toxinbildung von Staphylokokken hemmen können (REITER, 1964; KAO und FRAZIER, 1966; JEZESKI, 1967; ZALDUEGUI, 1969; HAYNES und HARMON, 1973; RICHARDSON und DIVATIA, 1973; u.a.), daß Penicillin die Vermehrung der antagonistischen Milchsäurebildner unterdrückt (SCHULZE, 1974; u.a.) und die Staphylokokkenvermehrung bis zu bestimmten Konzentrationen nicht beeinflußt.

Abschließend kann festgestellt werden, daß das Risiko einer Staphylokokkenintoxikation durch handelsübliche Rohmilch (Vorzugsmilch)

relativ gering ist, da die meisten natürlicherweise in der Milch vorkommenden Keimarten das Wachstum der Staphylokokken hemmen. Ist in Anlieferungsmilch bereits Enterotoxin gebildet worden, so wird durch die Vermischung in der Molkerei ein solcher Verdünnungseffekt erzielt, daß mit Toxinrückständen, welche für eine Erkrankung notwendig sind, kaum zu rechnen ist. Kommt es jedoch zu einer Rekontamination der erhitzten Milch mit enterotoxinbildenden Staphylokokken, ist unter bestimmten Bedingungen (Antibiotika, Lagerungstemperatur und Lagerungszeit) die für eine Intoxikation ausreichende Enterotoxinbildung nicht auszuschließen. Hierbei ist insbesondere an eine Reinfektion der Milch durch den Menschen zu denken, welcher relativ häufig Träger von Staphylokokken ist, und an die Tatsache, daß humane Stämme eher zur Toxinbildung befähigt sind als bovine.

Diese Aussagen gelten nur für Staphylokokkenenterotoxin B-bildende Stämme. Weitere Untersuchungen, insbesondere mit A-Toxinbildnern, sind zur Abklärung des Risikos erforderlich.

5. Zusammenfassung

- I. 55 handelsübliche Trinkmilchproben (30 pasteurisierte Vollmilch-, 10 pasteurisierte teilentrahmte Milch-, 10 Vorzugsmilch- und 5 ultrahocherhitzte Milchproben) wurden auf die Anwesenheit von koagulasepositiven Staphylokokken und den Gehalt an Staphylokokken-enterotoxinen A, B, C, D und E untersucht. Die Untersuchung auf Staphylokokken erfolgte mit dem Anreicherungsmedium nach GIOLITTI und CANTONI sowie dem BAIRD-PARKER-Medium, der Nachweis von Enterotoxin nach Extraktion mit dem von ZEHREN und ZEHREN modifizierten und ursprünglich von CASMAN und BENNETT entwickelten Verfahren im Objektträger-Gel-Diffusionstest nach WADSWORTH. Koagulasepositive Staphylokokken sowie die Enterotoxine A, B, C, D und E konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden.
- II. In Modellversuchen wurde die Wiedergewinnungsrate von Enterotoxin B mit dem bereits angewandten Verfahren (ZEHREN und ZEHREN) sowie mit dem Verfahren nach REISER et al. ermittelt. Anschließend wurden Staphylokokkenwachstum und Enterotoxinbildungsvermögen in verschiedenen Milchproben (pasteurisierte Vollmilch, Vorzugsmilch und ultrahocherhitzte Milch) und unter Berücksichtigung des Einflusses von Penicillin und Joghurtkulturen geprüft.

Die Wiedergewinnungsrate lag in Abhängigkeit von der zugesetzten Enterotoxin B-Konzentration (20 - 100 mcg/ml Milch) bei dem Verfahren nach ZEHREN und ZEHREN bei 0 bis 46%, bei dem Verfahren nach REISER et al. bei 10 bis 62%.

Bei 37°C konnte nach 24stündiger Bebrütung in ultrahocherhitzter Milch, Vorzugsmilch und keimarmer pasteurisierter Vollmilch Enterotoxin B bei Staphylokokkenzahlen von mehr als 15×10^7 /ml nachgewiesen werden. In keimhaltiger pasteurisierter Vollmilch wurde bei geringem Staphylokokkenwachstum kein Toxin gefunden.

Penicillin bewirkte bei pasteurisierter keimarmer Vollmilch mit zunehmender Konzentration einschließlich 5 IE/ml eine Stimulierung des Staphylokokkenwachstums. In ultrahocherhitzter Milch wurde bei steigenden Penicillinkonzentrationen (ab 0,5 IE/ml) vermindertes Staphylokokkenwachstum festgestellt. In Vorzugsmilch zeigte sich bei geringerer Staphylokokkenzahl/ml kein deutlicher Unterschied zwischen Penicillin-haltigen und -freien Proben. Dem Wachstum der Keime entsprechend konnte lediglich in penicillinhaltiger pasteurisierter Vollmilch bis 5 IE/ml sowie in ultrahocherhitzter Milch bis 0,5 IE/ml Penicillin Enterotoxin B nachgewiesen werden. In allen Vorzugsmilchproben verlief der Toxinnachweis negativ.

Joghurtkulturen in keimarmen pasteurisierten Vollmilchproben bewirkten starke Staphylokokkenhemmung, die durch Zusatz von Penicillin in Abhängigkeit von der Konzentration entsprechend stark aufgehoben werden konnte. Eine Wechselwirkung von Joghurtkulturen und Penicillinkonzentration konnte auch bei der Enterotoxinbildung ermittelt werden.

Summary

- I. 55 commercially available milk samples (30 pasteurized whole milk-, 10 pasteurized partial skimmed milk-, 10 certified milk- and 5 ultra-high-heated milk samples) were tested for coagulasepositive staphylococci and staphylococcal enterotoxins type A, B, C, D and E. The isolation of staphylococci was performed with the enrichment medium by GIOLITTI and CANTONI als well as with the BAIRD-PARKER medium. The enterotoxins were examined with the method by CASMAN and BENNETT modified by ZEHREN and ZEHREN and with the microslide diffusion test by WADSWORTH. Neither coagulasepositive staphylococci nor enterotoxins A, B, C, D or E could be detected.
- II. In additional tests the recovery of enterotoxin B with the method by ZEHREN and ZEHREN as well as with the method by REISER et al. were determined. Furthermore the growth of staphylococci and the production of enterotoxin in various milk samples (pasteurized whole milk, certified milk, ultra-high-heated milk) at 37°C were determined as well as the effect of penicillin and of yoghurt cultures.

The recovery was in relation to the initial enterotoxin B concentration (20 to 100 mcg/100 ml milk) and revealed with the method by ZEHREN and ZEHREN 0 to 46%, with the method by REISER et al. 10 to 62%.

After incubation at 37°C for 24 hours enterotoxin B could be detected in ultra-high-heated, certified milk and pasteurized whole milk samples with low total counts and more than 15×10^7 staphylococci/ml milk.

In pasteurized whole milk samples with higher total counts and minimal growth of staphylococci the toxin assay was negative.

The addition of penicillin to pasteurized whole milk with low total counts showed a stimulation of the growth of staphylococci with increasing penicillin concentration (incl. 5 IE/ml), whereas in ultra-high-heated milk with higher penicillin concentrations (more than 0,5 IE/ml) the number of staphylococci decreased. In certified milk with low numbers of staphylococci /ml no influence of penicillin could be noted. According to these bacteriological data enterotoxin B could be found only in pasteurized milk with penicillin (including 5 IE/ml) as well as in ultra-high-heated milk without and with 0,5 IE penicillin/ml. The examination on toxin of certified milk samples was negative.

Yoghurt cultures in pasteurized milk with low counts inhibited growth of staphylococci whereas the addition of penicillin enhanced the growth of staphylococci. Interactions between yoghurt cultures and concentrations of penicillin could be detected in the production of enterotoxin.

6. Literatur

ABO-ELNAGA, J.G. (1966):

Der Einfluß der Hitzebehandlung auf den Bakteriengehalt der Milch.
Milchwiss. 21, 561 - 564.

ABO-ELNAGA, J.G. und O. KANDLER (1965):

Zur Verbreitung der Staphylokokken in Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 16, 132 - 137.

ABRAMSON, C. (1972):

Staphylococcal enzymes.

in: COHEN, J.O.: The Staphylococci.

Wiley-Interscience, New York, London, Sydney, Toronto, 187 - 248.

ANGELOTTI, R. (1969):

Staphylococcal intoxications.

in: RIEMANN, H.: Food-borne infections and intoxications.

1. Aufl., Academic Press, New York und London, 359 - 393.

AVENA, R.M. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C,
Staphylococcus aureus strain 361.
Biochemistry 6, 1474 - 1480.

BAIRD-PARKER, A.C. (1972):

An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-
positive staphylococci.

J. Appl. Bact. 25, 12 - 19.

BARBER, M.A. (1914):

Milk poisoning due to a type of staphylococcus albus occurring in the
udder of a healthy cow.

Philippine J. Sci., Sec B 9, 515 - 519.

BARBER, L.E. und R.H. DEIBEL (1972):

Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage.

Appl. Microbiol. 24, 891 - 898.

BAUMGARTNER, H., P. KÄSTLI und P. HOFER (1968):

Das Verhalten von Staphylococcus aureus in Milch und bei Herstellung von Emmentalerkäse.

Schweiz. Milchzeitung 94, 994 - 998.

BELL, W.B. und M.O. VELIZ (1952):

Production of enterotoxin by staphylococci recovered from the bovine mammary gland.

Vet. Med. 47, 321 - 322.

BENNETT, R.W. (1971):

Persönliche Mitteilung.

BECKER, W. (1966):

Zerstörung von Antibiotika in der Milch durch Kurzzeiterhitzung.

Milchwiss. 21, 155 - 157.

BERGDOLL, M.S. (1968):

Staphylococcal enterotoxins in dried foods.

in: KAMPELMACHER, E.H., M. INGRAM und D.A.A. MOSSEL:

The Microbiology of Dried Foods.

Proc. Sixth Intern. Symposium on Food Microbiology, Bilthoven, 225 - 240.

DERSELBE (1970):

Enterotoxins.

in: MONTIE, T.C., S. CADIS und S.J. AJL:

Microbial Toxins, Bd. 3, 266 - 326.

Academic Press, New York und London.

DERSELBE (1972):

The enterotoxins.

in: COHEN, J.O.: The Staphylococci, 301 - 331.

Wiley-Interscience, New York, London, Sydney, Toronto.

BERGDOLL, M.S., M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1959):

Staphylococcal enterotoxins: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property.

J. Immunol. 83, 334 - 338.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA und R.M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.

J. Bact. 90, 1481 - 1485.

BERGDOLL, M.S., K.F. WEISS und M.J. MUSTER (1967):

The production of staphylococcal enterotoxin by a coagulase-negative strain.

Bact. Proc. Amer. Soc. Microbiologists, Baltimore, 12.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS (1971):

Identification of enterotoxin E.

Infect. Immun. 4, 593 - 595.

BERGDOLL, M.S. und R.N. ROBBINS (1973):

Characterization of types of staphylococcal enterotoxins.

J. Milk Food Technol. 36, 610 - 612.

BERGDOLL, M.S., R.N. ROBBINS, K.F. WEISS, C.R. BORJA, J.Y. HUANG und T.S. CHU (1973):

The staphylococcal enterotoxins: Similarities.

in: JELJASZEWICZ, J. und W. HRYNIEWICZ (1973):

Staphylococci and staphylococcal infections, 390 - 396.

BORJA, C.R. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137.

Biochemistry 6, 1467 - 1473.

BOZOVIC, V. (1963):

Prüfung des Benehmens der enterotoxinbildenden Staphylokokken bei der thermischen Bearbeitung der Milch und in Milchprodukten.

Acta Vet. Beograd 13, 45 - 46.

BRYAN, F.L. (1968):

What the sanitarian should know about staphylococci and salmonellae in non-dairy products. I. Staphylococci.

J. Milk Food Technol. 31, 110 - 116.

BURBIANKA, M. und J. DLUZNIEWSKA (1971):

Enterotoxic staphylococci and enterotoxins in human milk.

Roczn. panst. Zakl. Hig. 22, 537 - 544.

ref.: Dairy Sci. Abstr. 34, 235 (1972).

BURBIANKA, M., J. DLUZNIEWSKA, A. PLISZKA und B. WINDYGA (1973):

Enterotoxigenic staphylococci and enterotoxin in human milk.

in: JELJASZEWICZ, J. und W. HRYNIEWICZ (1973):

Staphylococci and staphylococcal infections, 441 - 447.

CASMAN, E.P. (1960):

Further serologic studies on staphylococcal enterotoxin.

J. Bact. 79, 849 - 856.

DERSELBE (1965):

Staphylococcal enterotoxin.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 128, 124 - 131.

DERSELBE (1967):

Staphylococcal food-Poisoning.

Health Lab. Sci. 4, 199 - 206.

CASMAN, E.P. und R.W. BENNETT (1965):

Detection of staphylococcal enterotoxin in food.

Appl. Microbiol. 13, 181 - 189.

CASMAN, E.P., R.W. BENNETT, A.E. DORSEY und J.A. ISSA (1967):

Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.

J. Bact. 94, 1875 - 1882.

CAUDILL, F.W. und M.A. MEYER (1943):

An epidemic of food-poisoning due to pasteurised milk.

J. Milk Food Technol. 6, 73.

ref.: ABO-ELNAGA und KANDLER (1965).

CHALLINOR, K., M. SCHERAGO und R.H. WEAVER (1943):

The occurrence of food-poisoning staphylococci in pasteurised milk.

J. Bact. 45, 577.

CHAPMAN, G.H. (1945):

The significance of sodium chloride in studies of staphylococci.

J. Bact. 50, 201 - 203.

CHERNEVSKI, N. (1963):

Study of the incidence of pathogenic streptococci and staphylococci in cows milk in the Kolarovgrad region.

Izv. vet.-khig. Inst. Zhivotin, Produzti 3, 91 - 96

ref.: Dairy Sci. Abstr. 26, 39 (1964).

CHU, F.S., K. THADHANI, E.J. SCHANTZ und M.S. BERGDOLL (1966):

Purification and characterization of staphylococcal enterotoxin A.

Biochem. 5, 3281 - 3289.

CLARK, W.S., T.D. MOORE und F.E. NELSON (1961):

Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from raw milk.

Appl. Microbiol. 9, 195 - 199.

CLARK, W.S. und F.E. NELSON (1961):

Multiplication of coagulase-positive staphylococci in grade A raw milk samples.

J. Dairy Sci. 44, 232 - 236.

CRABTREE, J.A. und W. LITTERER (1934):

Outbreak of milk poisoning due to a toxin-producing staphylococcus found in the udder of two cows.

Amer. J. Publ. Health 24, 1116 - 1120.

CROSSLEY, E.L. und M. CAMPLING (1957):

The influence of certain manufacturing processes on the staphylococcus aureus content of spray-dried milk.

J. Appl. Bacteriol. 20, 65 - 70.

DABBAH, R., W.A. MOATS und V.W. EDWARDS (1971):

Heat survivor curves of food-borne bacteria suspended in commercially sterilized whole milk. II. Bacteria other than Salmonella.

J. Dairy Sci. 54, 1772 - 1779.

DAHIYA, R.S. und M.L. SPECK (1968):

Hydroxyde peroxyde formation by Lactobacilli and its effect on Staphylococcus aureus.

J. Dairy Sci. 51, 1568 - 1572.

DALY, C., W.E. SANDINE und P.R. ELLIKER (1972):

Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: Streptococcus diacetylactis versus food pathogens.

J. Milk Food Technol. 35, 349 - 357.

DIGIACINTO, J.V. und W.C. FRAZIER (1966):

Effect of coliform and Proteus bacteria on growth of Staphylococcus aureus.

Appl. Microbiol. 14, 124 - 129.

DONNELLY, C.B., J.E. LESLIE und L.A. BLACK (1968):

Production of enterotoxin A in milk.

Appl. Microbiol. 16, 917 - 924.

DRYSDALE, A. (1950):

Staphylococcus aureus food poisoning. An account of an outbreak in Khartoum.

J. trop. Med. and Hyg. 53, 12 - 14.

EMMANOILIDOU-ARSENI, A. und D. SOULTANI (1960):

Antibacterial action of Gendide.

J. Bact. 80, 137 - 138.

ERDOS, T. und A. ULLMANN (1959):

Effect of Streptomycin on the incorporation of amino-acids labelled with carbon-14 into ribonucleid acid and protein in a cell-free system of a Mycobacterium.

Nature 28, 618 - 619.

ERICKSON, A. und R.H. DEIBEL (1973):

Production and heat stability of staphylococcal nuclease.

Appl. Microbiol. 25, 332 - 336.

EVANS, J.B., L.G. BUETTNER und C.F. NIVEN, Jr. (1950):

Evaluation of the coagulase test in the study of staphylococci associated with food-poisoning.

J. Bact. 60, 481 - 484.

FLABHOFF, J. (1974):

Erhebungen über den Hemmstoffgehalt von Rohmilchproben im Molkereieinzugsgebiet eines Landkreises in Nordrhein-Westfalen.

Vet. Med. Diss. München.

FRIEDMAN, M.E. (1966):

Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation in broth cultures.

J. Bact. 92, 277 - 278.

DERSELBE (1968):

Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation by cell wall blocking agents and other compounds.

J. Bact. 95, 1051 - 1055.

FRIEDMAN, M.E. und M.B. HOWARD (1971):

Induction of mutants of staphylococcus aureus 100 with increased ability to produce enterotoxin A.

J. Bact. 106, 289 - 291.

GALE, E.F. und J.P. FOLKES (1952):

The assimilation of amino-acids by bacteria: Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in staphylococcus aureus.

J. Biochem. 53, 493 - 498.

GALESLOOT, T.E. und J. STADHOUDERS (1968):

The microbiology of spray-dried milk products with special reference to Staphylococcus aureus and Salmonellae.

in: The microbiology of dried foods.

Proc. Sixth Int. Symposium Food Microbiol., Bilthoven, 313 - 340.

GANTZE, K. (1976):

Zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin in Lebensmitteln mittels Frochspermatest und dem vorgeschalteten Extraktionsverfahren.

Vet. Med. Diss., München.

GEDEK, W. (1968):

Koagulasepositive Staphylokokken aus Kuhmilch: III. Vergleiche mit humanpathogenen Stämmen.

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 7 - 11.

DERSELBE (1972):

Die Staphylokokken-Mastitis bei Haustieren.

VEB Gustav Fischer Verlag Jena.

GHOSH, S.S., V.K.N. NAMUDRIPAD und H. LAXMINARAYANA (1970):

Enterotoxinbildende Staphylokokken in Milch und Milchprodukten.

Kongreßbericht IDF-Kongreß, Sydney. Vol. II, Bd. III, 153.

GHOSH, S.S. und H. LAXMINARAYANA (1973):

Growth of staphylococci in relation to normal microflora and enterotoxin production in milk.

Indian J. of Animal Sci. 43 (11), 981 - 986.

GILBERT, R.J., A.A. WIENEKE, J. LANSER und M. SIMKOVICOVA (1972):

Serological detection of enterotoxins in foods implicated in staphylococcal food poisoning.

J. Hyg. Camb. 70, 755 - 762.

GILLILAND, S.E. und M.L. SPECK (1972):

Interactions of food starter cultures and food-borne pathogenes:

Lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae.

J. Milk Food Technol. 35, 307 - 310.

GIOLITTI, G. und C. CANTONI (1966):

A medium for the isolation of staphylococci from food-stuffs.

J. Appl. Bact. 29, 395 - 398.

GRAVES, R.R. und W.C. FRAZIER (1963):

Food organisms influencing the growth of *Staphylococcus aureus*.

Appl. Microbiol. 11, 513 - 516.

GRUBER, J. und G.G. WRIGHT (1969):

Ammonium sulfate coprecipitation antibody determination with purified staphylococcal enterotoxins.

J. Bact. 98, 18 - 24.

GRÜN, L. (1968):

Zur Bestimmung von Standortvarianten der Staphylokokken humaner und boviner Herkunft.

Milchwiss. 23, 604 - 608.

HACKLER, J.F. (1939):

Outbreak of staphylococcus milk poisoning in pasteurized milk.

Amer. J. Public Health 29, 1247 - 1249.

HAINES, W.C. und L.G. HARMON (1973 a):

Effect of variations in conditions of incubation upon inhibition of Staphylococcus aureus by Pediococcus cerevisiae and Streptococcus lactis.

Appl. Microbiol. 25, 169 - 172.

DIESELBEN (1973 b):

Effect of selected lactic acid bacteria on growth of Staphylococcus aureus and production of enterotoxin.

Appl. Microbiol. 25, 436 - 441.

HAJEK, V. und E. MARSALEK (1973):

Das Vorkommen enterotoxinbildender Staphylococcus aureus-Stämme in Wirtstieren verschiedener Arten.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 223, 63 - 68.

HALL, H.E., R. ANGELOTTI und K.H. LEWIS (1965):

Detection of staphylococcal enterotoxin in food.

Health Lab. Sci. 2, 179 - 191.

HAMMER, D. (1956):

Mikrokokkenmastitis der Ziege als Ursache einer Gruppenerkrankung beim Menschen.

Arch. Lebensmittelhyg. 2, 152 - 155.

HAUGE, S. (1951):

Durch enterotoxische, aus Milch herstammende Staphylokokken verursachte Staphylokokkenvergiftung.

Nord. Vet. Med. 3, 931 - 956.

ref.: Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 151, 303 (1953/54).

HAUKE, H. (1968):

Untersuchungen über die Inaktivierung antibiotikahaltiger Milch durch die Pasteurisierung.

Monatsh. Vet. Med. 23, 105 - 108.

HEINEMANN, H. (1957):

Growth and thermal destruction of micrococcus pyogenes var. aureus in heated and raw milk.

J. Dairy Sci. 40, 1585 - 1589.

HOLBROOK, R. und A.C. BAIRD-PARKER (1975):

Serological methods for the assay of staphylococcal enterotoxins.

Soc. Appl. Bacteriol., Bd. 8.

HUANG, J.-Y., T. SHIH, C.R. BORJA, R.M. AVENA und M.S. BERGDOLL (1967):

Amino acid composition and terminal amino acids of staphylococcal enterotoxin C.

Biochem. 6, 1480 - 1484.

IANDOLO, J.J., C.W. CLARK, L. BLUHM und Z.J. ORDAL (1965):

Repression of Staphylococcus aureus in associative culture.

Appl. Microbiol. 13, 646 - 649.

JACKSON, H. und W. WOODBINE (1963):

The effect of sublethal heat treatment on the growth of *Staphylococcus aureus*.

J. Appl. Bacteriol. 26, 152 - 158.

JAKUBICZ, P., J. FILIPCZUK und M. BOBROWSKI (1973):

Epidemiology of enterotoxin strains of *Staphylococcus aureus*.

in: JELJASZEWICZ, J. und W. HRYNIEWICZ (1973)

Staphylococci and Staphylococcal Infections, 521 - 525.

JAMLANG, E.M., M.L. BARTLETT und H.E. SNYDER (1971):

Effect of pH, protein concentration, and ionic strength on heat inactivation of staphylococcal enterotoxin B.

Appl. Microbiol. 22, 1034 - 1040.

JARVIS, A.W. und R.C. LAWRENCE (1970):

Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of staphylococci.

Appl. Microbiol. 4, 698 - 699.

JEZESKI, J.J., S.R. TATINI, P.C. DE GARCIA und J.C. OLSON (1967):

Influence of *Streptococcus lactis* on growth and enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* in milk.

Bacteriol. Proc. 12

ref.: MINOR und MARTH, 1971/72.

JOHNSON, H.M., J.A. BUKOVIC und P.E. KAUFMANN (1972):

Antigenic cross-reactivity of staphylococcal enterotoxins.

Inf. and Immun. 5, 645 - 647.

JONES, A.C., G.J.G. KING, H. FENNEL und D. STONE (1957):

The growth of *Staphylococcus aureus* in milk with special reference to food poisoning.

Monthly Bull. Ministry Health and Emergency Publ. Health Lab. Serv.

16, 109 - 121.

JUDGE, L.F. (1958):

Nutritional symbiosis through microbial associations.

Ph.D. Thesis, Univ. of Maryland, College Park.

zit. nach: GRAVES und FRAZIER (1963).

KAO, C.T. und W.C. FRAZIER (1966):

Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*.

Appl. Microbiol. 14, 251 - 255.

KANDLER, O. und H. FRANK (1962):

Vergleichende Untersuchung über die Hemmwirkung handelsüblicher Mastitispräparate gegenüber verschiedenen Säureweckern und Testorganismen.

XVI. Int. Dairy Congr. C, 535.

KIERMEIER, F. und E. LECHNER (1973):

Milch und Milcherzeugnisse.

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg.

KLUPSCH, H.J. (1968):

Sauermilcherzeugnisse.

Verlag Th. Mann GmbH., Hildesheim.

KOBAYASHI, A., Y. ARAI, S. IWAHARA und T. MATSUI (1955):

Outbreaks of staphylococcal food poisoning caused by the powdered skim milk.

Health Bureau, Tokyo Metropolitan Governm., Japan, 32.

zit. nach: BERGDOLL, M.S. (1968): Staphylococcal enterotoxins in dried foods.

KUHNT, V. (1974):

Zum Vorkommen von koagulasepositiven Staphylokokken und Enterotoxinen in sauren Milchprodukten.

Vet. Med. Diss., München.

LACHICA, R.V.F., K.F. WEISS und R.H. DEIBEL (1969):

Relationship among coagulase, enterotoxin, and heat-stable desoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*.

Appl. Microbiol. 18, 126 - 127.

LACHICA, R.V.F., R.D. HOEPSICH und C. GENIGEORGIS (1972):

Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods.

Appl. Microbiol. 23, 168 - 169.

LOTTER, L.P. und C.A. GENIGEORGIS (1975):

Desoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci.

Appl. Microbiol. 29, 152 - 158.

MARKUS, Z. und G.J. SILVERMAN (1968):

Enterotoxin B production by nongrowing cells of *staphylococcus aureus*.

J. Bact. 96, 1446 - 1447.

DIESELBEN (1969):

Enterotoxin B synthesis by replicating and nonreplicating cells of *staphylococcus aureus*.

J. Bact. 97, 506 - 512.

DIESELBEN (1970):

Factors affecting the secretion of staphylococcal enterotoxin A.

Appl. Microbiol. 20, 492 - 496.

MARSHALL, R.T., B. SINGH, S.A.S. SHAHIDI und H. EDMONDSON (1966):

Staphylococcus aureus counts as affected by time and temperature of storage of milk samples.

J. Dairy Sci. 703.

MASON, H.C. (1945):

Food-poisoning staphylococci and the order of their resistance to penicillin.

J. Immunol. 51, 307 - 315.

MAYER, S. (1975):

Enterotoxinbildungsvermögen boviner und humaner Staphylokokken unter Berücksichtigung der Antibiotikaresistenz und anderer biologischer Eigenschaften.

Vet.Med. Diss., München.

McCOY, D.W. und J.E. FABER (1966):

Influence of food microorganisms on staphylococcal growth and enterotoxin production in meat.

Appl. Microbiol. 14, 372 - 377.

McLEAN, R.A., H.D. LILLY und J.A. ALFORD (1968):

Effects of meat-curing salts and temperature on production of staphylococcal enterotoxin B.

J. Bact. 95, 1207 - 1211.

MEYER, J. (1973):

Zum Vorkommen von Staphylokokken-Enterotoxinen in Trockenmilchprodukten.

Vet. Med. Diss., Hannover.

MEYER, W. (1966 a):

Differenzierungsschema für Standortvarianten von Staphylococcus aureus.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 201, 465 - 481.

DERSELBE (1966 b):

Über die Brauchbarkeit des Koagulasetests mit verschiedenen Plasmaarten zur Differenzierung von Staphylococcus aureus-Stämmen.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 201, 331 - 338.

MINETT, F.C. (1938):

Experiments on staphylococcus food poisoning.

J. Hyg. 38, 623 - 637.

MINOR, T.E. und E.H. MARTH (1971/72):

Staphylococcus aureus and staphylococcal food intoxications. A review.

J. Milk Food Technol. 34, 557 - 564, 35, 21 - 29, 77 - 82, 228 - 239.

DIESELBEN (1972 a):

Loss of viability by Staphylococcus aureus in acidified media.

J. Milk Food Technol. 35, 191 - 196.

MOOREHEAD, S. und H.H. WEISER (1946):

The survival of staphylococci food poisoning strain in the gut and excreta of the house fly.

J. Milk Food Technol. 9, 253 - 259.

ref.: MINOR und MARTH (1971/72) 35, 21 - 29.

MORSE, S.A., R.A. MAH und W.J. DOBROGOSZ (1969):

Regulation of staphylococcal enterotoxin B.

J. Bacteriol. 98, 4 - 9.

MÜLLER, F.J. und J. STOJANOW (1971):

Die epidemiologie der Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung.

Alimenta 1, 22 - 27.

MURRAY, J.G. (1960):

The incidence and possible significance of staphylococcus aureus in milk.

Res. Exp. Rec. Min. Agric. North Ireland 10, 167 - 174.

MYHR, A.N. und J.C. OLSON (1956):

A study of thermal resistance of micrococci in milk.

J. Dairy Sci. 39, 1635 - 1693.

NOLTING, K. (1968):

Zum Vorkommen von Micrococcaceae in klinisch gesunden Rindereutern.
Vet. Med. Diss., Hannover.

OBERHOFER, T.R. und W.C. FRAZIER (1961):

Competition of staphylococcus aureus with other organisms.

J. Milk Food Technol. 24, 172 - 175.

zit. nach: GRAVES und FRAZIER (1963).

OBIGER, G. (1960):

Zur Frage der milchhygienischen Bedeutung der Staphylokokken.

Arch. Lebensmittelhyg. 12, 265 - 271.

DERSELBE (1961):

Zum Pathogenitätsbegriff und -nachweis von Staphylokokken aus Milch.

Monatshefte Tierheilk. 13, 225 - 239.

DERSELBE (1963):

Hemmstoffe in der Anlieferungsmilch und Methoden zu ihrem Nachweis.

Arch. Lebensmittelhyg. 1, 10 - 19.

OLSON, J.C., E.P. CASMAN, E.F. BAER und J.E. STONE (1969):

Enterotoxigenicity of staphylococcus aureus strains isolated from acute cases of bovine mastitis.

J. Dairy Sci. 52, 879.

DIESELBEN (1970):

Enterotoxigenicity of staphylococcus aureus cultures isolated from acute cases of bovine mastitis.

Appl. Microbiol. 20, 605 - 607.

OMORI, G. und J. KATO (1959):

A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase-negative strain.

Biken's J. 2, 92.

OSTASHEVSKI, A.G. und V.P. OBRAZTSOV (1966):

Enterotoxicity of staphylococci isolated from the milk of cows with subclinical and latent mastitis.

Veterinarya, 127 - 132.

ref.: Dairy Sci. Abstr. 31, 523 (1969).

ODIN, J. (1952):

III. Techniques and analysis of the quantitative precipitation reaction.

B. Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis.

Methods Med. Res. 5, 335 - 378.

PETER, M. (1968):

Antibiotikaresistenz von Staphylokokken boviner Herkunft aus landwirtschaftlichen Betrieben mit intensiver tierärztlicher Euterüberwachung.

Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 81, 153 - 155.

PETRUSHINA, L.I. und I.S. NIKOLAEVA (1975):

Relationship between staphylococcal counts and accumulation of enterotoxin type A in milk.

Gigiena i Sanitariya Nr. 4, 113 - 115.

PULVERER, G. (1965):

Pathogene Staphylokokken bei Mensch, Tier und im Freiland.

Fortschr. d. Medizin 83, 459 - 462.

DERSELBE (1966):

Vergleich pathogener Staphylokokken von Mensch und Tier.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 201, 27 - 41.

PULVERER, G. und H.J. ENTEL (1967):

Physiologisches Vorkommen koagulasepositiver Staphylokokken im Tierreich.

II. Differenzierung der koagulasepositiven Staphylokokkenstämme aus dem Nasen-Rachen-Raum gesunder Tiere.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 202, 351 - 363.

RADICH, R., W.E. SANDINE und P.R. ELLIKER (1969):

Inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Streptococcus diacetylactis* in milk and cream fitting.

J. Dairy Sci. 52, 880.

RAJ, H.D. und M.S. BERGDOLL (1969):

Effect of enterotoxin B on human volunteers.

J. Bact. 98, 833 - 834.

RAMSEY, R.J. und P.H. TRACY (1930):

Food poisoning probably caused by orange colored staphylococcus from udders of apparently healthy cows.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 28, 390 - 391.

READ, R.B., Jr. und J.G. BRADSHAW (1966):

Staphylococcal enterotoxin B thermal inactivation in milk.

J. Dairy Sci. 49, 202 - 203.

READ, R.B., W.L. PRITCHARD, J.G. BRADSHAW und L.A. BLACK (1965):

In vitro assay of staphylococcal enterotoxins A and B from milk.

J. Dairy Sci. 48, 420 - 424.

RENNER, E. (1974):

Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen.

Volkswirtschaftl. Verlag GmbH., Kempten.

REISER, R.F. und K.F. WEISS (1969):

Production of staphylococcal enterotoxins A, B and C in various media.

Appl. Microbiol. 18, 1041 - 1043.

REISER, R.F., D. CONAWAY und M.S. BERGDOLL (1974):

Detection of staphylococcal enterotoxin in foods.

Appl. Microbiol. 1, 83 - 85.

REITER, B., B.G. FEWINS, T.F. FRYER und E. SHARPE (1964):
Factors affecting the multiplication and survival of coagulase
positive staphylococci in cheddar cheese.
J. Dairy Res. 31, 261.

REUTER, J. (1972):
Untersuchungen zur antagonistischen Wirkung der Milchsäurebakterien
auf andere Keimgruppen der Lebensmittelflora.
Zbl. Vet. Med. B 19, 320 - 334.

RICHARDSON, G.H. und M.A. DIVATIA (1973):
Lactic culture inocula required to inhibit staphylococci in sterile
milk.
J. Dairy Sci. 56, 706 - 709.

RICHTER, B. (1974):
Zur Produktion von Staphylokokkenenterotoxin B in verschiedenen
flüssigen Nährmedien.
Vet. Med. Diss., München.

RITTMEYER, H. (1964):
Kurzer Beitrag über das Vorkommen von Staphylokokken in Vorzugsmilch.
Arch. Lebensmittelhyg. 15, 223 - 225.

ROBERN, H., St. STAVRIC und N. DICKIE (1975):
The application of QAE-Sephadex for the purification of two
staphylococcal enterotoxins. II. Purification of enterotoxin A.
Biochem. et Biophys. 393, 159 - 164.

ROSENWALD, A.J. und R.E. LINCOLN (1966):
Streptomycin inhibition of elaboration of staphylococcal enterotoxin
protein.
J. Bact. 92, 279 - 280.

RUTHERFORD, P.S. und R.C. CROWSON (1945):

The bacteriology of an epidemic of staphylococcal food poisoning.

J. Can. Med. Assoc. 52, 19 - 20.

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, M.J. WOODBURN, J.M. LYNCH, H.M. JACOBY,
S.J. SILVERMAN, J.C. GORMAN und L. SPERO (1972):

Purification and some chemical and physical properties of staphylo-
coccal enterotoxin A.

Biochem. 11, 360 - 366.

SCHEUSNER, D.L., L.L. HOOD und L.G. HARMON (1973):

Effect of temperature and pH on growth and enterotoxin production by
staphylococcus aureus.

J. Milk Food Technol. 36, 249 - 252.

SCHMIDT, J. (1936):

Erkrankungen bei Menschen nach Genuß von Milch einer euterkranken Ziege.

Berl. Tierärztl. Wschr. 27, 438 - 439.

SCHMIDT, H., W. WEIS und H. WEVER (1972):

Untersuchungen über den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin in
Milch und anderen Lebensmitteln.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 141 - 146.

SCHULZ, M.E. (1965):

Das große Molkerei-Lexikon.

Volkswirtschaftl. Verlag GmbH., Kempten.

SCHULTZE, F.D. (1967):

Typenbestimmung von Staphylococcus aureus aus Rinderherden mit hoher
Mastitisfrequenz.

Vet. Med. Diss., München.

SCHURR, S. (1970):

Untersuchungen zum Enterotoxinbildungsvermögen und zur Hitze-resistenz von aus Milch isolierten Staphylokokken.

Vet. Med. Diss., Hannover.

SEELEMANN, M., G. OBIGER, H.G. RACKOW und W. WELZ (1963):

Staphylokokkenbefunde und ihre Bedeutung bei der Überwachung von Vorzugsmilch.

Kieler Milchwirtsch. Forschber. 15, 89 - 102.

SHAUGHNESSY, H.J. und T.C. GRUBB (1936):

Staphylococcus food poisoning.

J. Infect. Dis. 58, 318 - 323.

SHEIKH, M.J. und L.O. LUEDECKE (1974):

Staphylococcus aureus in commercially processed fluid dairy and non-dairy products.

J. Milk Food Technol. 6, 329 - 332.

SILVERMAN, S.J., A.R. KNOTT und M. HOWARD (1968):

Rapid sensitive assay for staphylococcal enterotoxin and a comparison of serological methods.

Appl. Microbiol. 16, 1019 - 1023.

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128 - 137.

STEEDE, F.D.F. und J.L.S. IREDALE (1962):

Staphylococcal infection of raw milk as a cause of food poisoning.

Monthly Bull. Min. Health 21, 121 - 127.

STEEDE, F.D.F. und W. SMITH (1954):

Staphylococcal food-poisoning due to infected cow's milk.

J. Brit. Med. 11, 576 - 578.

STOJANOW, J. und E. SCHENK (1966):

Verfahren zur präparativen Isolierung von Staphylokokken-Enterotoxinen aus Lebensmitteln.

DDR Patentschrift 50358.

STOLMAKOWA, A.N. (1954):

Образование стафилококкового enterотоксина в пищевых продуктах в условиях эксперимента.

Experimenteller Beitrag von Staphylokokken-Enterotoxin in Lebensmitteln.

Gigiena y Sanit. 7, 28 - 31.

ref.: Dairy Sci. Abstr. 16, 839.

SUGIYAMA, H., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1960):

In vitro studies on staphylococcal enterotoxin production.

J. Bact. 80, 265 - 270.

DIESELBEN (1969):

Enterotoxin B synthesis by replicating and non-replicating cells of *Staphylococcus aureus*.

J. Bact. 97, 506 - 512.

TAKAHASHI, J. und C.K. JOHNS (1959):

Staphylococcus aureus in cheddar cheese.

J. Dairy Sci. 42, 1032 - 1037.

TANNER, F.W. und R.J. RAMSEY (1932):

Food poisoning due to a yellow micrococcus from milk.

Amer. J. Med. Sci. 184, 80 - 85.

TATINI, S.R. (1975):

Anwendung einer hitzestabilen Nuclease zum Screening von Nahrungsmitteln auf die vermutliche Anwesenheit von Enterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 24.

TATINI, S.R. (1973):

Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins.

J. Milk Food Technol. 11, 559 - 563.

TATINI, S.R., J.J. JEZESKI, J.C. OLSON, Jr. und E.P. CASMAN (1971):

Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk.

J. Dairy Sci. 54, 312 - 320.

TERPLAN, G. (1967):

Bewertung von Staphylokokkenbefunden in Milch.

Vortrag, Dtsch. Vet.-Med. Gesellsch., 11. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene, Göttingen.

DERSELBE (1969):

Bakteriologische Probleme bei der Milcherzeugung.

Dtsch. Tierärzteblatt 12, 589 - 594.

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1967):

Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch - eine kurze Übersicht.

Milchwiss. 22, 761 - 771.

DIESELBEN (1969):

Zur diagnostischen und lebensmittelhygienischen Bedeutung von *Staphylococcus aureus* in Kuhmilch.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 76, 217 - 221.

DIESELBEN (1974):

Detoxifizierung von Toxinen mikrobiellen Ursprungs.

Forschungsbericht aus der Wehrmedizin BMVg-FBWM 74-4.

Herausgegeben im Auftrag des Bundesministeriums der Verteidigung vom Dokumentationszentrum der Bundeswehr, Bonn, Friedrich-Ebert-Allee 34.

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF und S. BOBETH (1971):

Zum Vorkommen und Nachweis von enterotoxinbildenden Staphylokokken in Milch.

Alimenta 10, Sondernummer, 51 - 56.

THATCHER, F.S. und D. ROSS (1960):

Multiplication of staphylococci during cheese-making. The influence of milk storage temperatures and of antibiotics.

Can. J. Publ. Health 51, 226 - 234.

THATCHER, F.S. und W. SIMON (1956):

A comparative appraisal of the properties of staphylococci isolated from clinical sites and from dairy products.

Can. J. Microbiol. 2, 703 - 714.

TOLLE, A., W. HEESCHEN, J. REICHMUTH und H. KIND (1971):

Trinkmilch in der Bundesrepublik Deutschland: Eine Untersuchung zum bakteriologischen, biochemischen und rückstandsanalytischen Status.

Kieler Milchwirtsch. Forschungsberichte 23, 339 - 456.

TROLLER, J.A. und W.C. FRAZIER (1963):

Repression of staphylococcus aureus by food bacteria.

Appl. Microbiol. 11, 11 - 14, 163 - 165.

UNTERMANN, F. (1969):

Enterotoxinbildende Staphylokokken in Lebensmitteln.

Arch. Hyg. 153, 421 - 426.

DERSELBE (1972 a):

Vorkommen enterotoxinbildender Staphylokokken bei Mensch und Tier und ihre lebensmittelhygienische Bedeutung.

Fortschritte der Veterinärmedizin, Heft 17, 167 - 170.

DERSELBE (1972 b):

Zum Vorkommen von enterotoxinbildenden Staphylokokken beim Menschen.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 222, 18 - 26.

UNTERMANN, F. und H. SINELL (1970):

Beitrag zum Vorkommen enterotoxinbildender Staphylokokken.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 215, 166 - 172.

UNTERMANN, F., D. KUSCH und H. LUPKE (1973):

Zur Bedeutung der Mastitis-Staphylokokken als Ursache von Lebensmittelvergiftungen.

Milchwiss. 11, 686 - 688.

WADSWORTH, C. (1957):

A slide microtechnique for the analysis of immune precipitates in gel.

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 10, 355 - 360.

WALKER, G.C. und L.G. HARMON (1963):

Thermal resistance of *Staphylococcus aureus*.

J. Dairy Sci. 46, 601.

DIESELBEN (1965):

The growth and persistence of *Staphylococcus aureus* in milk and broth substrates.

J. Food Sci. 30, 351 - 358.

WALLACE, G.D., W.B. QUISENBERRY und M.A. HARNE (1960):

Preliminary report of human staphylococcal infection associated with mastitis in dairy cattle.

Publ. Health Rep. 75, 457 - 460.

WARNING, J.F. (1953):

J. Dairy Sci. Abstr. 15, 146.

ref.: WORSECK et al. (1960).

WEED, L.A., A.C. MICHAEL und R.N. HARGER (1943):

Staphylococcus intoxication with two fatalities due to milk from a goat suffering from *staphylococcus mastitis*.

J. Bact. 45, 414.

WILSON, E., M.J. FOTER und K.H. LEWIS (1959):

A rapid test for detecting staphylococcus aureus in food.
Appl. Microbiol. 7, 22 - 26.

WODSAK, W. (1959):

Bedeutung und Nachweis der Antibiotika in der Milch.
Nahrung 3, 729 - 736.

WORSECK, M. (1956):

Staphylokokken als Ursache von Lebensmittelvergiftungen und eigene Untersuchungen über die Toxizität von Mastitisstaphylokokken.
Arch. Lebensmittelhyg. 7, 145 - 148.

WORSECK, M., J. GÜRLICH und J. HEMLEP (1960):

Enterotoxische Staphylokokken in Rohmilch Berliner Abmelkbetriebe.
J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immun. 4, 123 - 130.

ZALDUEGUI, C.P. (1969):

Enterotoxin production of Staphylococcus aureus in milk.
Revta. esp. lech. 73, 113 - 123.
ref.: Dairy Sci. Abstr. 32, 114.

ZEHREN, V.L. und V.F. ZEHREN (1968):

Examination of large quantities of cheese for staphylococcal enterotoxin A.
J. Dairy Sci. 51, 635 - 644.

ZOTTOLA, E.A. und J.J. JEZESKI (1963):

Effect of heat treatment on Staphylococcus aureus in milk and cheese during commercial manufacture.
J. Dairy Sci. 46, 600.

ZOTTOLA, E.A., J.J. JEZESKI und A.N. AL-DULAIMI (1969):

Effect of short-time subpasteurization treatments on the destruction of Staphylococcus aureus in milk for cheese-manufacture.
J. Dairy Sci. 52, 1707 - 1714.

Abschließend danke ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas sowie für seine wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung bei der Ausführung meiner Arbeit.

Besonders herzlich danke ich auch Frau Dr. J. Feist-Köhler und Herrn Dr. K.-J. Zaadhof für ihre Beratung sowie der jederzeit gern gewährten Unterstützung bei der Anfertigung meiner Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Lebenslauf

Am 10. September 1947 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Ernst Brunnthaler und seiner Ehefrau Franziska, geb. Stocker, in Pfaffenhofen a.d. Ilm geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Scheyern trat ich 1959 in das Camerloher-Gymnasium in Freising ein, wo ich am 21. Juli 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1967/68 nahm ich an der Universität München das Studium der Tiermedizin auf, das ich am 11. Oktober 1972 mit der tierärztlichen Prüfung abschloß. Die Approbation wurde mir am 10. November 1972 erteilt.

Im Winter 1973 begann ich am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs mit meiner Doktorarbeit. Nach dem praktischen Teil meiner Arbeit war ich in einer Kleintierpraxis beschäftigt und seit Juni 1975 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der I. Medizinischen Tierklinik tätig.

